



TITLE:

大脳皮質におけるニューロアクティ
ブステロイドによる興奮性神経
毒性の制御機構に関する研究(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

白川, 久志

CITATION:

白川, 久志. 大脳皮質におけるニューロアクティブステロイドによる興奮性神経毒性の制御機構に関する研究. 京都大学, 2005, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

2005-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k11494>

RIGHT:

大脳皮質におけるニューロアクティブステロイドによる
興奮性神経毒性の制御機構に関する研究

2004

白川 久志

大脳皮質におけるニューロアクティブステロイドによる
興奮性神経毒性の制御機構に関する研究

2004

白川 久志

目 次

緒言	1
第一章 ニューロアクティブステロイドによるNMDA誘発神経細胞死に対する制御	5
実験方法	5
実験結果	9
考察	17
第二章 ニューロアクティブステロイドによるカイニン酸および AMPA誘発神経細胞死に対する制御	20
実験結果	20
実験結果	
第一節 カイニン酸誘発神経細胞死に対する ニューロアクティブステロイドの作用	23
第二節 AMPA誘発神経細胞死に対するニューロアクティブステロイドの作用	34
考察	43
第三章 興奮毒性および虚血傷害に対するaminoglutethimideの保護作用	46
実験方法	47
実験結果	
第一節 興奮毒性に対するaminoglutethimideの作用	49
第二節 虚血傷害に対するaminoglutethimideの作用	60
考察	64
総括および結論	67
謝辞	68
発表論文目録	69
引用文献	70

緒 言

脳虚血に伴う低酸素-低血糖時には、通常は細胞内に存在するグルタミン酸などの興奮性アミノ酸が細胞外へ大量に流出し、その対応する受容体の過剰な活性化を介して神経細胞が異常に興奮する結果、神経細胞障害が発生し機能障害に繋がるとする興奮毒性仮説が広く受け入れられている。さらに近年、アルツハイマー病やパーキンソン病といった難治性中枢神経変性疾患における神経細胞死の重要な要因の一つとしても、グルタミン酸の過剰遊離による興奮性神経毒性の関与が指摘されてきた。

グルタミン酸受容体は、チャネルを内蔵して速いシナプス伝達を担うイオンチャネル型グルタミン酸受容体と、Gタンパクやチロシンキナーゼによる細胞内の生化学的反応を介する代謝型グルタミン酸受容体とに大別される。イオンチャネル型グルタミン酸受容体は Ca^{2+} に高い透過性を示すが Mg^{2+} による電位依存的阻害を強く受ける*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 型受容体と、主として Na^{+} および K^{+} を透過させ速い興奮性シナプス伝達を担う non-NMDA 型受容体に分類され、さらに non-NMDA 型受容体はその親和性の違いからカイニン酸型受容体と α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 型受容体に分類される。

病態時において細胞外へ大量に放出されたグルタミン酸はシナプス後膜上にある non-NMDA 型受容体に結合してシナプス後電位を起こす。その結果、シナプス後ニューロンが脱分極して活動電位が生じ、 Mg^{2+} による NMDA 受容体の阻害が解除され、グルタミン酸による NMDA 受容体刺激により細胞内へ大量の Ca^{2+} が流入する。シナプス後電位の発生により細胞内から AMPA 受容体の細胞膜上へのさらなる動員が起こり脱分極の増強を招く。この結果、細胞内の Ca^{2+} 濃度が高まり種々の Ca^{2+} 依存性酵素が異常に活性化され細胞機能が破綻すると想定されている。したがって、グルタミン酸受容体の過剰な活性化を抑制することは、脳虚血をはじめとする中枢神経変性疾患に伴う神経細胞死に対する有力な治療方法の一つと推察できる。また高等動物の中枢神経系における重要な興奮性神経伝達物質の一つであるグルタミン酸が、病態時などに過剰に遊離されることにより興奮毒としての側面を持つことは、生体にはこの神経伝達物質が何らかの機序により「誤って」過剰に遊離された場合に対処する内因性の保護機構が備わっていると推察されるが、その詳細についての多くは未解明のままである。

ニューロアクティブステロイドとは中枢および末梢神経系に作用するステロイド化合物の総称であり、その生合成の第一段階は cholesterol C17 位の側鎖の切断による pregnenolone の生成である。ニューロアクティブステロイドには、ニューロンやグリア細胞においてその生合成が証明されている dehydroepiandrosterone (DHEA) やその硫酸体である dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) および pregnenolone sulfate (PREGS) といった脳内在性のステロイドホルモンであるニューロステロイドをはじめ、性ホルモンなどの神経系に作用する末梢臓器由来のステロイドホルモン、およびニューロステロイドの合成類似体なども含まれ、その脳内濃度は加齢・性周期やストレスなどと関連して変化することが知られている。

一般に、ステロイドホルモンは細胞内受容体に結合したのち核内に移行し、タンパクの *de novo* 合成を介してその作用を発現し生体ホメオスタシスを制御しているが、ニューロアクティブステロイドもまたゲノミックな作用を有することが知られている。Corticosterone は遺伝子の転写を介して電位依存性 Ca^{2+} チャネルの機能を増強することでストレス性の細胞死を誘導し、黄体ホルモンである progesterone は小脳プルキンエ細胞で合成された後、ゲノミックな作用を介して樹状突起の伸展やシナプス形成を担うことが報告されている。ニューロアクティブステロイドはこのようなゲノムを介した作用に加えて、細胞膜に存在する神経伝達物質受容体に急性的に作用することによりその調節作用を発揮することが知られている。Allopregnanolone

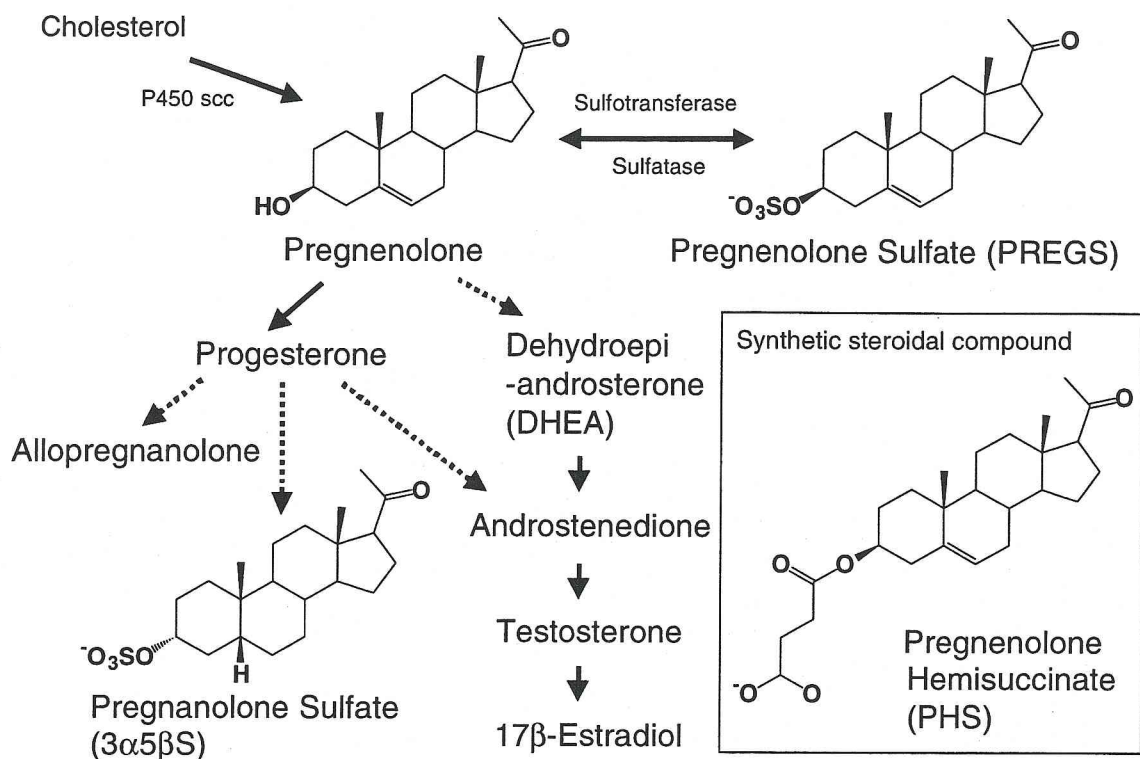
は γ -aminobutyric acid_A (GABA_A) 受容体チャネルの開閉持続時間および開閉頻度を増加させることによりその受容体機能を増強し、逆に PREGS や DHEAS は抑制的に働くことが示されている。その他には NMDA 型グルタミン酸受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、5-HT₃ 受容体やシグマ受容体に対する急性的な制御作用も知られ、近年その結合部位の一部も明らかになりつつある。ニューロアクティブステロイドの高次情報中枢に対する作用は、記憶・学習に対する増強や不安・催眠および、けいれんやうつ、統合失調症といった病態の発現に深く関連付けられており、これらの疾患の治療薬への応用も期待されている。しかしながら、脳虚血および種々の難治性中枢神経変性疾患に伴う興奮性神経毒性におけるニューロアクティブステロイドの役割に関してはほとんど解明されていないことから、その役割を解明することは中枢神経変性疾患の予防・治療薬と成り得るリード化合物の創製において重要な役割を果たすと考えられる。そこで本研究において著者は内在性物質としてニューロアクティブステロイドに着目してその興奮毒性に対する作用について研究を進めた結果、以下の新知見を得た。

(1) Progesterone の代謝産物である 5 β -pregnan-3 α -ol-20-one sulfate (pregnanolone sulfate; 3 α 5 β S) は濃度依存的に NMDA 誘発神経細胞死を抑制したが、PREGS および pregnenolone hemisuccinate (PHS) は増強した。さらに 3 α 5 β S は NMDA 誘発電流およびグルタミン酸誘発細胞内 Ca²⁺ 濃度増大応答を抑制したが、逆に PREGS および PHS は増強したことから、ニューロアクティブステロイドは急性的に NMDA 受容体機能を調節することにより NMDA 誘発神経細胞死に影響を及ぼすことが明らかとなった。

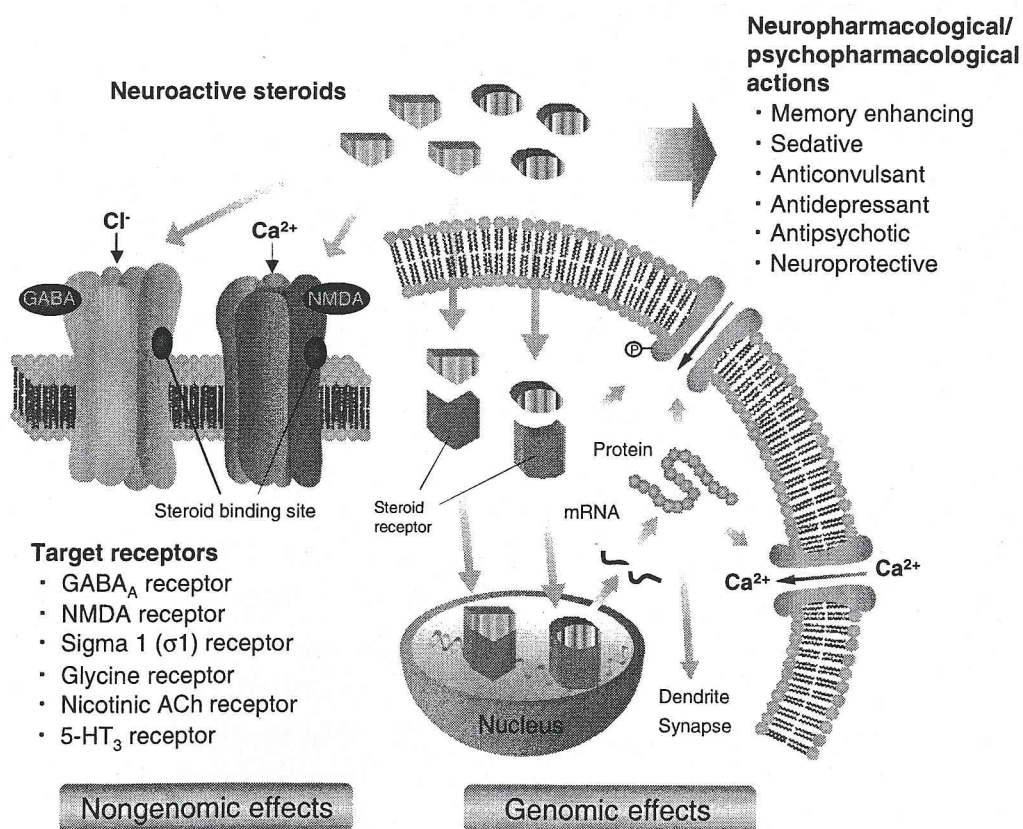
(2) PREGS は濃度依存的にカイニン酸および AMPA 誘発神経細胞死を抑制した。さらに PREGS はカイニン酸および AMPA 誘発電流を抑制し、カイニン酸誘発細胞内 Ca²⁺ 濃度増大応答を抑制したことから PREGS は急性的に non-NMDA 受容体機能を抑制することによりカイニン酸および AMPA 誘発神経細胞死を減弱することが明らかとなった。

(3) Aminoglutethimide (AGT) を長期間投与することにより、ステロイド潤滑作用とは異なる作用を介して興奮毒性が減弱された。さらに AGT は化学的虚血負荷により誘発される過剰なグルタミン酸遊離を急性的な作用を介して抑制することにより虚血傷害を顕著に減弱し、AGT が興奮毒性および虚血傷害に対して神経保護物質として働くことが明らかとなった。

これらの研究成果について以下に三章に分けて論述する。



ニューロアクティブステロイドの生合成および代謝経路



中枢神経系におけるニューロアクティブステロイドの作用の概念図

なお、本文中および図中で使用した略号は以下の通りである。

3 α 5 β S;	5 β -pregnan-3 α -ol-20-one sulfate (pregnanolone sulfate)
AGT;	aminoglutethimide
AMPA;	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AP-5;	2-amino-5-phosphonopentanoic acid
BIM;	bisindolylmaleimide
cAMP;	cyclic adenosine monophosphate
CNQX;	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
db-cAMP;	dibutyl cyclic adenosine monophosphate
DCNP;	2,4-dichloro-6-nitrophenol
DHEA;	dehydroepiandrosterone
DHEAS;	dehydroepiandrosterone sulfate
DIV;	days <i>in vitro</i>
DMSO;	dimethyl sulfoxide
EMATE;	estrone-3- <i>O</i> -sulfamate
GABA;	γ -aminobutyric acid
GAMS;	γ -D-glutamylaminomethyl sulfonic acid
HS;	horse serum
LDH;	lactate dehydrogenase
MAPK;	mitogen-activated protein kinase
MAPKK;	mitogen-activated protein kinase kinase
MTT;	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NAS;	1-naphthylacetylspermine
NBQX;	2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline
NMDA;	<i>N</i> -methyl-D-aspartate
PBS;	phosphate buffered saline
P450 c17;	17 α -hydroxylase/17,20 lyase
PHS;	pregnenolone hemisuccinate
PI;	propidium iodide
PI3K;	phosphatidylinositol 3 kinase
PKA;	protein kinase A
PKC;	protein kinase C
PMA;	phorbol-12-myristate-13-acetate
PREGS;	pregnenolone sulfate
P450 scc;	cytochrome p450 side chain cleavage enzyme
RU-486;	11 β -[4-dimethylamino]phenyl-17 β -hydroxy-17-[1-propynyl]estra-4,9-dien-3-one

第一章

ニューロアクティブステロイドによる NMDA 誘発神経細胞死に対する制御

グルタミン酸は高等脊椎動物の中樞神経系における主要な神経伝達物質であるが、脳虚血をはじめとする病態時において過剰に遊離することで神経細胞に対して興奮毒として働くことから、生理的に相反する二面性を有することはよく知られている。脳虚血に起因するグルタミン酸の大量漏出は、グルタミン酸受容体の過剰な賦活を介して神経細胞死を惹起するが、その過程において細胞内への大量の Ca^{2+} の流入が重要な役割を果たすことが示されている[1,2,10,12]。グルタミン酸受容体サブタイプのうち Ca^{2+} の透過性が非常に高いNMDA受容体は、その遮断薬が虚血傷害を顕著に抑制することから[74]、脳虚血に伴う興奮性神経毒性において中心的な役割を果たしていると考えられている[48]。

ニューロアクティブステロイドとは中枢および末梢神経系に作用するステロイド化合物の総称であり、その血中濃度は加齢・性周期やストレスなどにより変化することが知られている[6,64,66]。Pregnenoloneは脳内に最も豊富に存在するニューロアクティブステロイドの一種であり、全てのステロイドホルモンの前駆体であるが、その硫酸体であるPREGSは抑制性シナプス伝達を担う GABA_A 受容体機能を減弱する一方で[41,59]、興奮性シナプス伝達を担うNMDA受容体機能を増強し[24,83,91]、*in vivo*の実験においては痙攣誘発薬として作用することが報告されている[89]。さらにPREGSが培養海馬神経細胞におけるNMDA毒性に対して増悪作用を示すが[86]、DHEASは減弱作用を示すことが報告されている[33]。しかしながら、ニューロアクティブステロイドの脳皮質における作用については未解明な点が多く、さらにニューロアクティブステロイドの受容体機能調節作用と興奮毒性との相関性についてもほとんど解明されていない。

そこで著者はNMDA受容体の過剰刺激により誘発される神経細胞死に対するニューロアクティブステロイドの作用を、切片培養系および分散培養系の脳皮質神経細胞を用いて検討した。その結果、progesteroneの還元体である $3\alpha5\beta\text{S}$ がNMDA誘発神経毒性を顕著に減弱する一方でPREGSおよび、その合成類似体であるPHSが増悪することを明らかにし、さらにこれら3種類のステロイド化合物のNMDA誘発神経細胞死に対する調節作用の機序について解析を行った。

実験方法

試薬

本研究にて用いた試薬の購入元は、試薬名の後ろに括弧書きで記した。D,L-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D,L-AP-5)、Corticosterone、cytosine β -D-arabinofuranoside hydrochloride、DHEA、DHEAS、pregnenolone、MK-801、forskolin、bisindolylmaleimide (BIM) および phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) は Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA) より購入した。 $3\alpha5\beta\text{S}$ 、PREGS および PHS は Steraloids Inc. (Newport, RI, USA) より、cycloheximide、dibutyl cyclic AMP (db-cAMP) および trypan blue は和光純薬工業 (大阪) より購入した。*R*(+)-3-(3-Hydroxyphenyl)-*N*-propylpiperidine (3-PPP)、rimcazone dihydrochloride は Research Biochemicals International (Natick, MA, USA) より、Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura-2 AM) は同人化学研究所 (熊本) より購入した。その他の記載のない試薬に関しては、すべてナカライテスク (京都) より購入した。

培養大脳皮質切片の調製及び維持

生後2-3日齢のWistar/STラット(日本SLC、静岡)を氷中で1-2分冷やすことにより低温麻酔をかけ、70%エタノール処理後クリーンベンチ内に入れた。以降の操作は滅菌環境下で行った。ハサミで断頭した後、先曲りピンセットにて頭蓋内より全脳を取り出し、氷冷したハanks液(NaCl , 137 mM; KCl , 5.4 mM; Na_2HPO_4 , 3.4 mM; K_2HPO_4 , 0.5 mM; D-glucose, 5.6 mM; HEPES, 2.4 mM)の溶液を、95% O_2 /5% CO_2 の混合ガスで30分以上バブリングし、1 N NaOH にてpHを7.2に調製後、孔径0.22 μm のフィルターで濾過滅菌したもの)に浸けた。約1分間氷冷した後、全脳をハanks液で湿らせた濾紙上に置き、滅菌済みのフェザーカミソリで半球に切断した。脳半球は切断面を下にしてスパーテルですくい、tissue slice chopper (Narishige、東京)の可動台に設置したアクリル板(2.5 \times 7cm)に置き、滅菌したキムワイプを用いて脳半球から余分な水分を吸収した。Tissue slice chopperにより厚さ300 μm の大脳皮質冠状断切片を作製後、約6 mlの25%ウマ血清含有培地(50% Earle's minimum essential medium / HEPES (GIBCO, Invitrogen Japan, 東京)、25% Hanks' balanced salt solution (GIBCO)、25% 非働化ウマ血清 (GIBCO)の割合で混合し、6.5 mg/ml D-glucose、2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin G potassium (GIBCO) および 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin sulfate (GIBCO)を添加したもの)を用いて60 mlディッシュに流し込んだ。実体顕微鏡下にて、平匙により切片を1枚ずつはがし分けた後、頭頂部大脳皮質および線条体を含む切片を選び出し中隔野や前脳基底核などを切り落とした。あらかじめ6 well multiwell plate (Corning Costar, 東京)に1 mlの25%ウマ血清含有培地を入れ、直径30 mm Millicell-CM insert membrane (孔径0.4 μm , polytetrafluoroethylene製、Millipore, Bedford, MA, USA)を浸しておき34℃で30分以上維持しておき、そのmembrane上に1 inner dish 当たり6-7枚の切片を置き、34℃、5% CO_2 環境下で静置界面培養を行った。培地交換は別の6 well multiwell plateに0.7 mlの25%ウマ血清含有培地を入れ、34℃で30分以上維持した後、inner dishごと移すことにより行い、培養切片作製の翌日から隔日で行った。このようにして11-12日間培養した大脳皮質切片は*in vivo*に類似した細胞構築を有していた。培養10-11日目より無血清培地(75% Earle's minimum essential medium / HEPES (GIBCO)、25% Hanks' balanced salt solution (GIBCO)の割合で混合し、6.5 mg/ml D-glucose、2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin G potassium および 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin sulfate (GIBCO)を添加したもの)で24時間維持した後、グルタミン酸受容体アゴニスト投与または化学的虚血負荷の実験に用いた。

培養大脳皮質切片における薬物処置及びNMDA神経毒性の組織学的評価

無血清培地で24時間維持した培養切片を、NMDA及び各薬物を含んだ無血清培地を用いて24時間維持することにより薬物処置を行った。薬物の前処置は培養10-11日目より無血清培地で維持する際に薬物を24時間培地に添加することにより行った。

神経毒性はNissl染色により評価した。薬物処置後の培養切片を4% paraformaldehydeを用いて一晩以上固定した。精製水により5分間の洗浄を2回行った後、0.1% toluidine blue 溶液(Na_2HPO_4 , 10.94 g; Citric acid \cdot H_2O , 14.11 gを精製水1000 mlに溶解してから、 NaOH を用いてpH4.0に調製後、1 gのtoluidine blue (Chroma, Kongen, Germany)を溶解したもの)を用いて15分間染色した。染色終了後、精製水で2回洗浄してから、70%、96%、100%のエタノールを用いて脱水した後、Entellan Neu (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)により封入した。Nissl染色により明瞭な輪郭及び核が染色されるNissl染色陽性細胞を生存細胞として顕微鏡観察により単位面積(80 μm \times 90 μm)当たりの細胞数を計数することにより神経毒性を評価した。

初代分散培養大脳皮質細胞の調製及び維持

Wistar/ST ラット (妊娠 17-19 日齢) をネンブタール注射液 (ペントバルビタールナトリウム 60 mg/kg i.p. 大日本製薬、大阪) で麻酔し、37℃程度に加温した 0.1% ヒビテン液 (住友製薬、大阪) にて頭部を除く全身を消毒した。腹部にイソジン液 (明治製菓、東京) を塗布した後、下腹部を切開して子宮を摘出し、氷冷したハンクス液 (NaCl, 137 mM; KCl, 5.4 mM; Na_2HPO_4 , 3.4 mM; K_2HPO_4 , 0.5 mM; D-glucose, 5.6 mM; HEPES, 2.4 mM) の溶液を、95% O_2 /5% CO_2 の混合ガスで 30 分以上バブリングし、1 N NaOH で pH 7.2 に調製後、孔径 0.22 μm のフィルターで濾過滅菌したもの) に浸けた。子宮をハンクス液にて氷冷した後シャーレに移し胎仔を摘出した。胎仔を断頭し、コニカルチューブに集め氷冷下に保存し、以降の操作はクリーンベンチ内にて滅菌環境下で行った。実体顕微鏡を用いて頭部より全脳を摘出後、終脳の正中線にそって左右の大脳半球に切り分けた。間脳および海馬を含む大脳辺縁系を切り落とした後、大脳基底核を大脳皮質から切り離し、最後に硬膜を除去した。単離した大脳皮質をコニカルチューブに移し、摘出操作中に混入したバクテリア等を除去する目的で 10 ml のハンクス液で 5 回洗浄した。大脳皮質をシャーレに移し過剰なハンクス液を除去し、メスを用いて細切した後、10 ml のハンクス液を加え、パストゥールピペットを用いてピペッティングし、細胞を懸濁させた。さらにステンレスメッシュ (150 mesh/inch) で濾過することにより単離細胞懸濁液を得た。この細胞懸濁液を 1000 rpm にて約 3 分間遠心し、得られた大脳皮質細胞を 10% ウシ胎仔血清 (JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA) 含有イーグル液 10 ml (イーグル MEM 培地原末 (日水製薬、東京), 9.4 g; NaHCO_3 , 2.0 g; L-glutamine, 0.29 g; D-glucose, 1.0 g; HEPES, 2.38 g を精製水 (最終液量 1000 ml) に溶解した後、95% O_2 /5% CO_2 混合ガスで 30 分以上バブリングし、孔径 0.22 μm のフィルターで濾過滅菌したもの) に懸濁した。細胞懸濁液の一部を用いて、0.4% trypan blue 溶液にて染色し、血球計数板により懸濁液の細胞密度を決定した後、適量の 10% ウシ胎仔血清含有イーグル液を用いて 1.7×10^6 cells/ml になるように細胞懸濁液を調製した。この細胞懸濁液を、0.1% ポリエチレンイミンでコーティングしたカバースリップまたはカバーガラスを置いたディッシュに $0.4\text{--}0.5 \times 10^6$ cells/cm² の密度で播種した。細胞は 37℃, 5% CO_2 条件に設定した CO_2 インキュベーターで維持し、培養開始翌日より隔日で培地交換を行った。グリアの増殖を抑制するために、培養 6 日目に cytosine β -D-arabinofuranoside (10 μM) を投与した。培養初日から 7 日目までは 10% ウシ胎仔血清含有イーグル液を、培養 8-13 日目までは 10% ウマ血清 (JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA) 含有イーグル液を用いた。実験には培養 11-13 日目の成熟した細胞を用いた。

初代分散培養大脳皮質細胞における薬物処置および神経毒性の評価

薬物処置は各薬物を含む血清不含培地中で 1 時間インキュベートすることにより行った。神経毒性の評価は、薬物処置後の大脳皮質細胞を 1.5% trypan blue 溶液で 10 分間染色し、10% 中性ホルマリン溶液で細胞を固定し、生理食塩水で洗浄した後、染色細胞を死亡細胞、非染色細胞を生存細胞として計数して、その総数に対する生存細胞数の百分率を細胞の生存率とすることにより評価した。

電気生理学

ホールセル膜電流は、初代分散培養大脳皮質細胞を用いてパッチクランプ法により行った。ガラスパッチ電極 (抵抗値 4-7 M Ω) は microelectrode puller (P87, Sutter instrument, Novato, CA, USA) を用いて作製し、細胞内液 (145 mM CsCl; 11 mM EGTA; 4 mM Mg-ATP; 10 mM HEPES; CsOH を用いて pH 7.2 に調整) を満たして実験に使用した。細胞外液 (145 mM NaCl; 5 mM KCl; 2 mM CaCl_2 ; 10 mM HEPES; 10 mM D-glucose; 10 mM glycine; 1 N NaOH を用いて pH 7.4 に調

製) は 2-3 ml/min の流速でチャンバー内を灌流させた。薬物は細管 (内径 280 μm) を 7 本束ねて作製した重力を駆動力とした薬物投与システムを用いて 200-300 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流速で細胞の近傍より適用した。細胞の保持電位を -60 mV として EPC9 patch clamp amplifier (HEKA, Lambrecht, Germany) を用いて室温 (23-25 $^{\circ}\text{C}$) で記録した。Series resistance の補正は行わなかった。薬物適用の際には、薬物のみを含む溶液を 10 秒間前処置した後、薬物とグルタミン酸受容体アゴニストを含む溶液を 10 秒間適用し、その後細胞外液により洗浄した。グルタミン酸受容体アゴニストの適用間隔は約 1 分間とし、各薬物の作用は、グルタミン酸受容体アゴニスト投与直後の電流のピーク値を、グルタミン酸受容体アゴニスト単独適用時の値に対して百分率で算出することにより評価した。

細胞内 Ca^{2+} 濃度測定

細胞内 Ca^{2+} 濃度測定は、蛍光 Ca^{2+} キレーターである Fura-2 AM を用いて行った。Fura-2 はそれ自体強い陰性電荷を有しているため細胞膜を透過できないが、5 個の carboxyl 基を acetoxymethyl ester (Fura-2 AM) にすることで脂溶性が高まり、細胞内へ容易に透過することが可能となる。細胞内に侵入した Fura-2 AM は細胞内のエステラーゼによりエステル部分が加水分解されることにより Ca^{2+} キレート能を有する Fura-2 になる。この形態では細胞膜透過性は無いため、長時間細胞内に留置することになる。

実験には 0.1% ポリエチレンイミンでコーティングした直径 13 mm のカバーガラス (松浪硝子工業、大阪) 上に培養した大脳皮質細胞 (培養 11-13 日目) を用いた。培養大脳皮質細胞を 5 μM Fura-2 AM および 0.01% cremophore EL (Sigma) を含む Krebs-Riger 緩衝生理食塩水 (137 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl_2 ; 10 mM, 1.5 mM CaCl_2 ; 10 mM HEPES; 25 mM D-glucose, NaOH を用いて pH 7.4 に調製) 中、37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間維持した後、細胞を Krebs-Riger 緩衝生理食塩水で洗浄してからカバーガラスを測定用チャンバーにセットした。実験は室温 (23-25 $^{\circ}\text{C}$) にて行った。

蛍光イメージングには超高感度カメラ (SIT カメラ) を装着した Ca^{2+} 測定用画像解析装置 ARGUS-HiSCA イメージングシステム (浜松ホトニクス、浜松) を用いた。細胞に波長 340 nm および 380 nm の励起光を各々 2 秒間隔で与え、蛍光を 500 nm の蛍光干渉フィルターを介して測定した。Fura-2 は Ca^{2+} をキレートすると、340 nm で励起される蛍光強度は増大し、380 nm で励起される蛍光強度は減少する特性を持っており、測定データは 340 nm/380 nm の蛍光強度比で表した。

各薬物およびステロイド化合物の投与はグルタミン酸投与 1 分前に行い、細胞内 Ca^{2+} 濃度の計測時間は予備実験においてグルタミン酸誘発神経細胞死が起こらないことが確認された 10 分間とした。データはグルタミン酸投与後から測定終了までの曲線下面積 (AUC) およびグルタミン酸投与直後の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇のピーク値 (Peak amplitude) を Ca^{2+} 流入量の指標として算出し、グルタミン酸単独群における値を 100% として示した。

統計

データは全て、平均値 \pm 標準誤差で表した。培養大脳皮質切片の生存数を示したデータおよび細胞内 Ca^{2+} 濃度測定のデータにおける統計処理は Student-Newmann-Keuls' test を用い、初代培養大脳皮質細胞のデータにおいては Dunnett' test (両側検定) を用いた。電気生理学的検討のデータにおいては paired t-test を用いた。全ての実験において危険率 5% 未満の際に統計学的な有意差があると判定した。

実験結果

NMDA 誘発神経細胞死の濃度依存性

はじめに大脳皮質切片培養においてNMDAにより誘発される神経細胞死を検討した。培養10-11日目に切片を24時間無血清培地で維持した後、NMDAを24時間投与したところ、生存神経細胞数は濃度依存的に減少し、その EC_{50} 値は $17.5\text{ }\mu\text{M}$ であった(図1-1,2)。

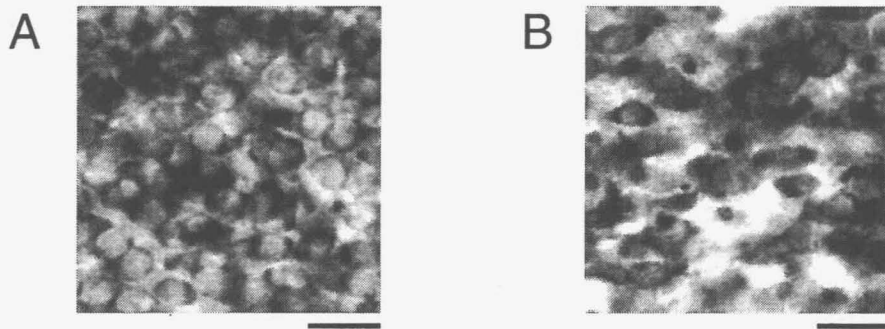


図1-1 培養大脳皮質切片におけるNMDA誘発神経細胞死の典型例

典型例の写真は各々(A) control、(B) NMDA ($20\text{ }\mu\text{M}$) 処置群を表す。明確な輪郭を有しているNissl染色陽性細胞を生存細胞と同定した。スケールバーは $20\text{ }\mu\text{m}$ を示す。

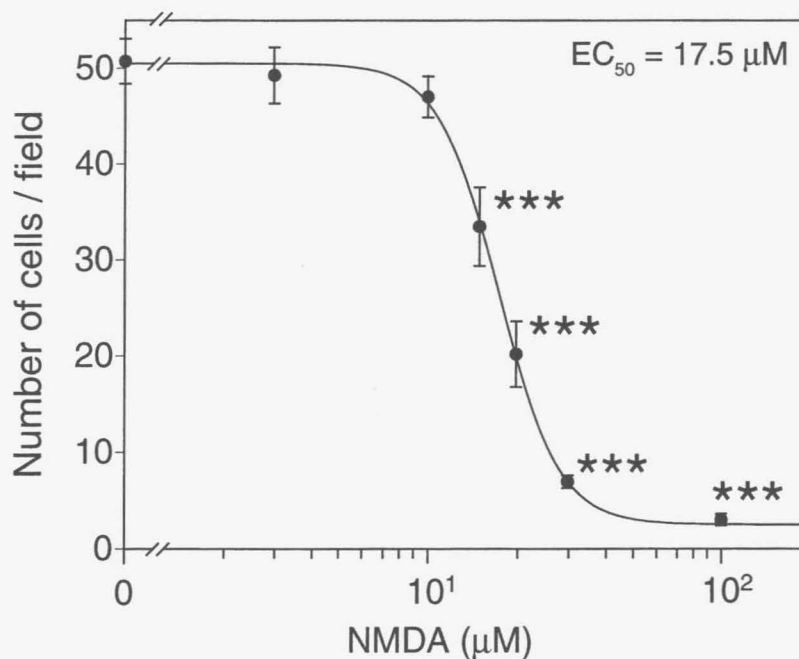


図1-2 NMDA誘発神経細胞死の濃度依存性

切片を培養10-11日目より無血清培地で24時間維持した後、NMDA ($0\text{--}100\text{ }\mu\text{M}$) を24時間投与した。縦軸は単位面積 ($80\text{ }\mu\text{m} \times 90\text{ }\mu\text{m}$) 当たりの顕微鏡観察下による生存細胞数を、横軸はNMDAの処置濃度を示す。n = 11-12. *** $P < 0.001$ vs control ($0\text{ }\mu\text{M}$ NMDA)。

NMDA 誘発神経細胞死に対するステロイド化合物の作用

脳内に最も多く存在するニューロアクティブステロイドの一種である pregnenolone、その代謝産物であり加齢と共に減少することが知られている DHEA、その硫酸抱合体である DHEAS、糖質コルチコイドである corticosterone、および合成糖質コルチコイドであり臨床で広く用いられている prednisolone は 24 時間の前処置および NMDA との 24 時間の同時処置によっても NMDA 誘発神経細胞死に対して影響を及ぼさなかった (図 1-3)。一方、progesterone の代謝産物である $3\alpha5\beta S$ (300 μM) は、NMDA により誘発される細胞生存率の低下を顕著に抑制したが、逆に pregnenolone の硫酸抱合体である PREGS (100 μM) およびその合成類似体である PHS (30 μM) は NMDA による細胞生存率の低下を顕著に増悪した (図 1-3)。これらのニューロアクティブステロイドの細胞死調節作用は 24 時間の前処置を行っても有意に変化することはなかった (図 1-3)。以降の実験では、NMDA 誘発神経細胞死に対する調節作用の観察されたこれら 3 種類のニューロアクティブステロイドの作用について検討を行った。

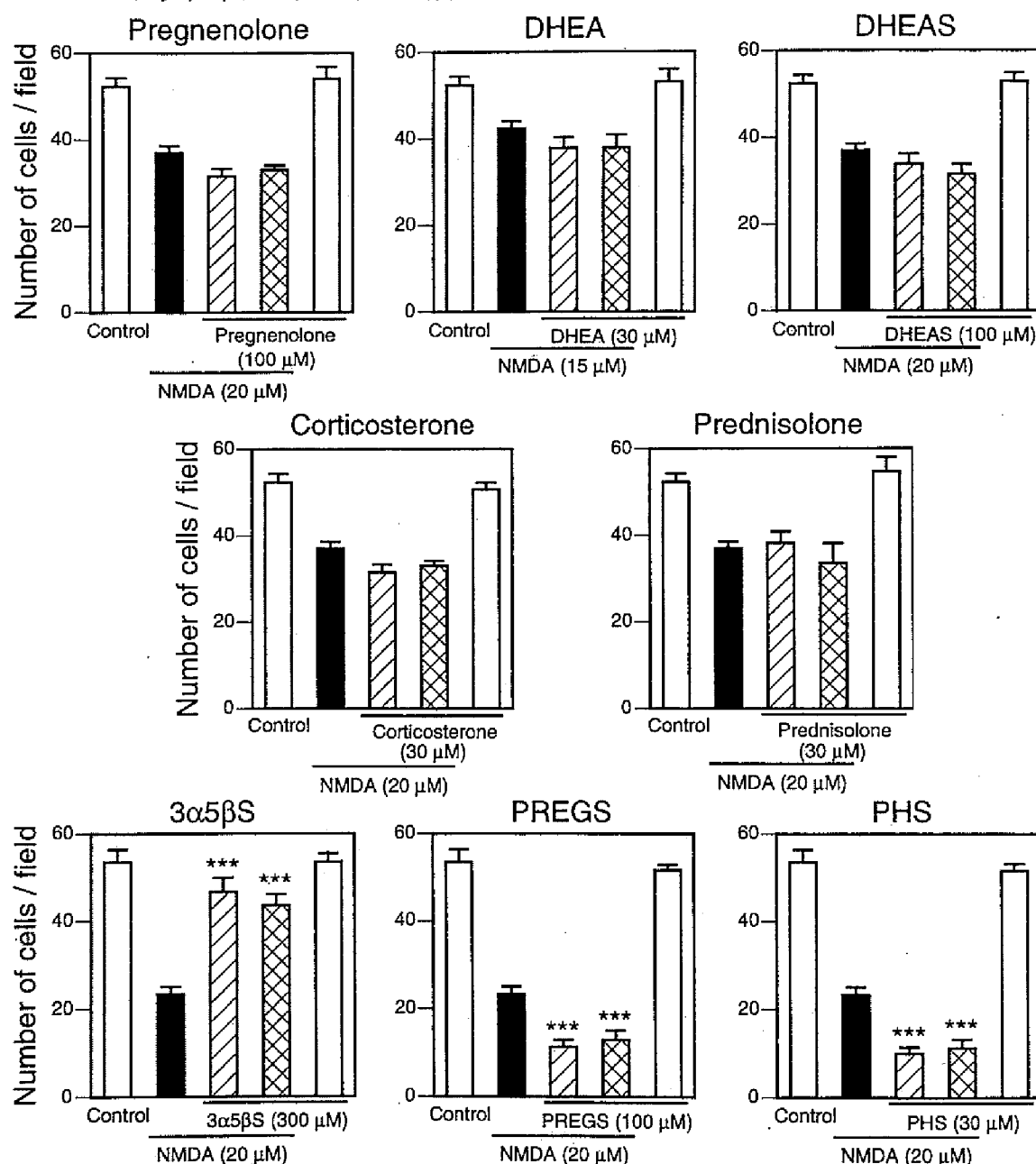


図 1-3 NMDA 誘発神経細胞死に対するニューロアクティブステロイドの作用

各ニューロアクティブステロイドは NMDA 処置の 24 時間前から同時まで (hatched bar) または NMDA と同時に (cross-hatched bar) 24 時間投与した。n = 5-6. *** $P < 0.001$ vs NMDA alone.

3 α 5 β S、PREGS および PHS の NMDA 誘発神経細胞死に対する濃度依存的調節作用

3 α 5 β S は 100-300 μ M の濃度範囲において NMDA 誘発神経細胞死を濃度依存的に減弱し、一方 PREGS は 100-300 μ M の濃度範囲において、PHS は 30-100 μ M の濃度範囲において NMDA 誘発神経細胞死を濃度依存的に増悪した (図 1-4)。

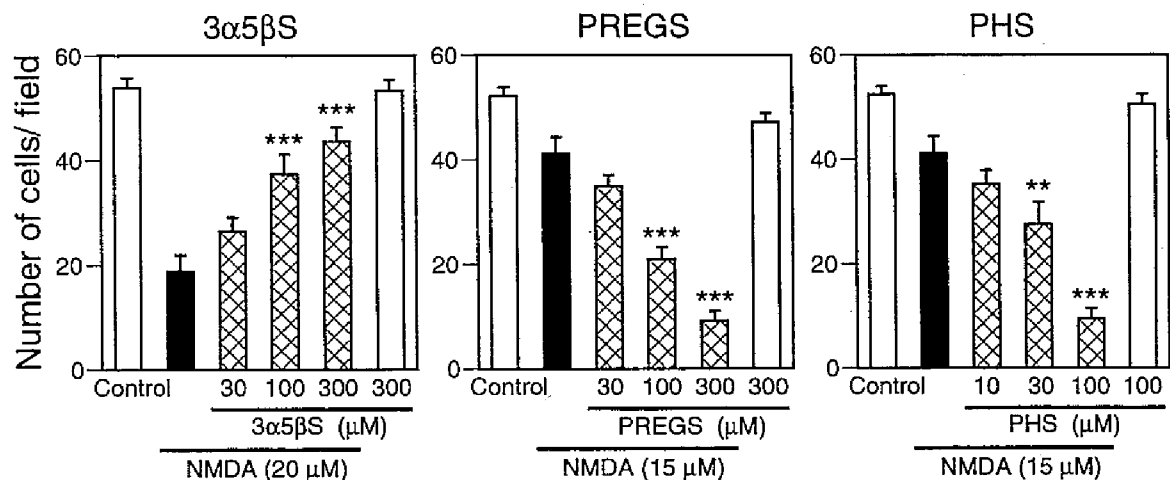


図 1-4 NMDA 誘発神経細胞死に対する 3 α 5 β S、PREGS および PHS の濃度依存的細胞死調節作用
各ニューロアクティブステロイドは NMDA と同時に切片に 24 時間投与した。n = 11-12. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs NMDA alone.

3 α 5 β S、PREGS および PHS による NMDA 誘発神経細胞死調節作用機序の検討

ステロイドホルモンの主要な生物活性は、核内ステロイド受容体に結合した後、タンパクの *de novo* 合成を介して発揮されることが知られている [47,66,67]。そこで NMDA 誘発神経細胞死に影響を与えた 3 種のニューロアクティブステロイドの作用が核内受容体を介したものであるか否かを検討する目的で、タンパク合成阻害薬である cycloheximide (0.1 μ g/ml) を用いて 24 時間の前処置および NMDA との同時処置を行ったが、これら 3 種のニューロアクティブステロイドの細胞死調節作用に有意な影響は及ぼさなかった (図 1-5)。

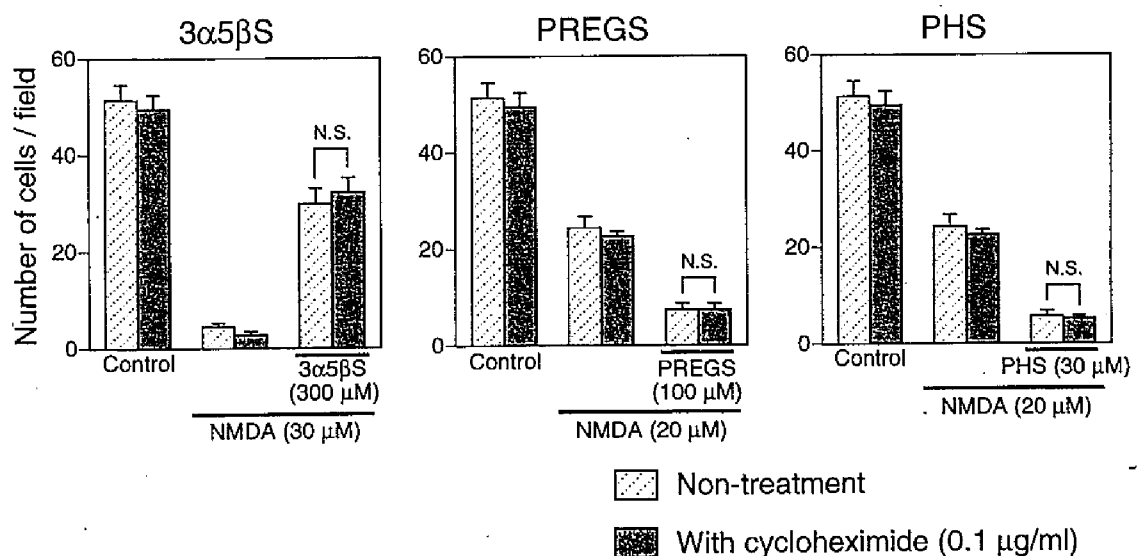


図 1-5 3 α 5 β S、PREGS および PHS の細胞死調節作用に対するタンパク合成阻害薬の作用
各ニューロアクティブステロイドおよび cycloheximide は NMDA 処置の 24 時間前から投与し、NMDA と同時においても 24 時間投与した。n = 5-6. N.S.; not significant.

ニューロアクティブステロイドはGABA_A受容体に結合してその機能を調節する作用を有することが知られており[41,59]、培養大脳皮質神経細胞において、GABA_A受容体アゴニストが興奮毒性に対して保護作用を発揮することが報告されている[53,56]。またニューロアクティブステロイドは神経保護活性に関与が示唆されているシグマ受容体に結合してその機能を調節する作用を有することも知られている[8,46,54]。そこで、GABA_A受容体アンタゴニストであるpicrotoxin (100 μ M)、およびシグマ受容体アンタゴニストであるrimcazole (10 μ M)を投与して、これら3種のニューロアクティブステロイドに対する作用を検討したが、いずれのニューロアクティブステロイドの作用もこれらのアンタゴニストによる影響を受けなかった(図1-6A,B)。また、GABA受容体のアゴニストであるGABA (100 μ M)、およびシグマ受容体アゴニストである3-PPP (100 μ M)はNMDA誘発神経細胞死に対して有意な影響を与えなかった。

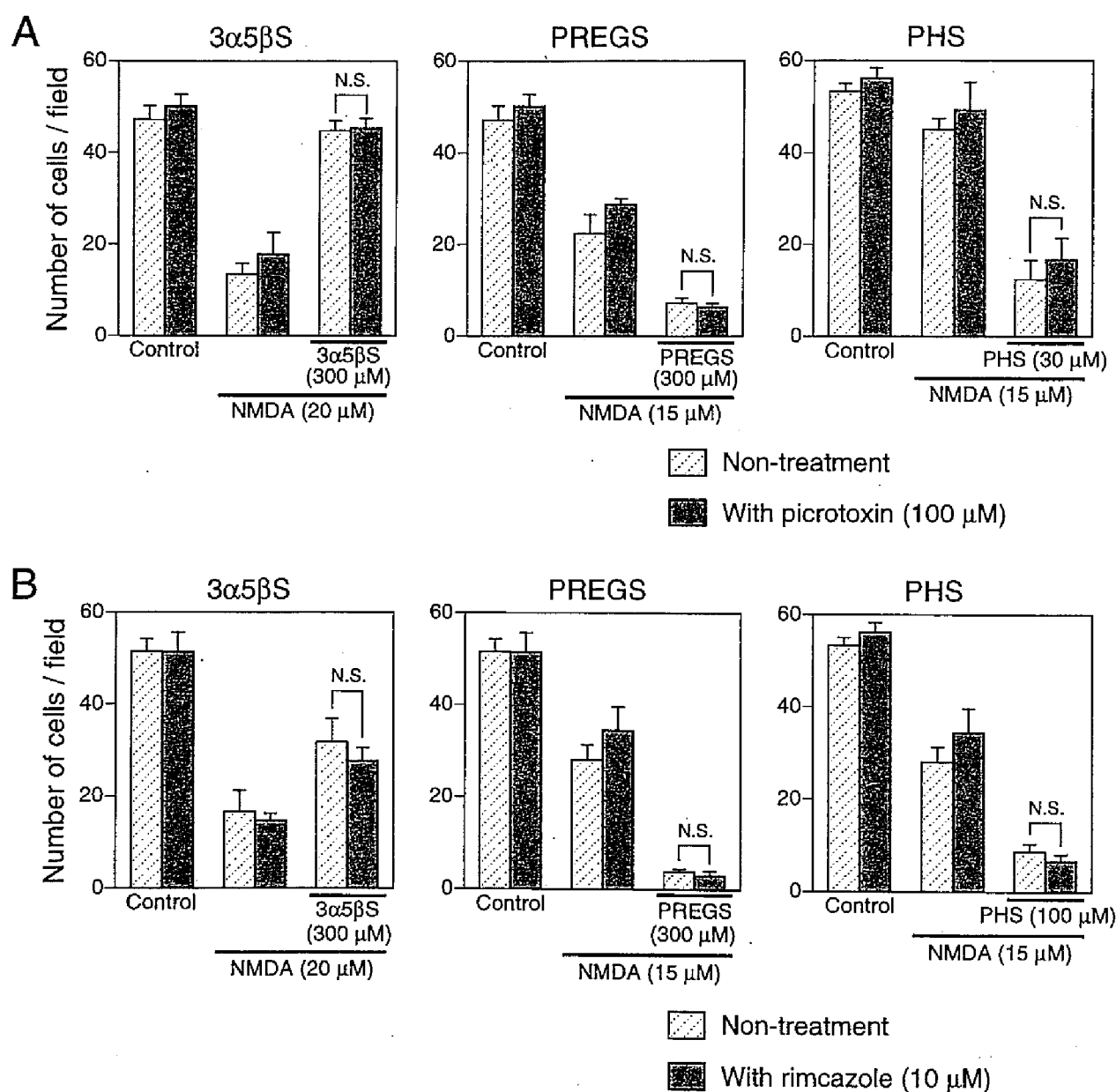


図1-6 3 α 5 β S、PREGS および PHS の細胞死調節作用に対する GABA_A 受容体遮断薬およびシグマ受容体遮断薬の作用

各ニューロアクティブステロイドおよびpicrotoxin (A) またはrimcazole (B) はNMDAと同時に24時間投与した。n = 5-6. N.S.; not significant.

NMDA 受容体は protein kinase A (PKA) または protein kinase C (PKC) などのキナーゼによりリン酸化による調節を受けることが知られており[19,42]、一部のニューロアクティブステロイドの神経伝達物質受容体に対する作用がPKAまたはPKCにより調節されることも報告されている[14,20]。そこで、アデニル酸シクラーゼの活性化薬である forskolin (20 μ M) および膜透過性cAMPアナログである db-cAMP (1 mM) を用いて、これら3種のニューロアクティブステロイドの作用を検討したが、有意な変化は観察されなかった (図1-7A)。さらに、PKCの活性化薬である PMA (100 nM) およびPKC阻害薬である BIM (500 nM) を用いて、同様にこれら3種のニューロアクティブステロイドの作用を検討したが、有意な影響は確認できなかった (図1-7B)。

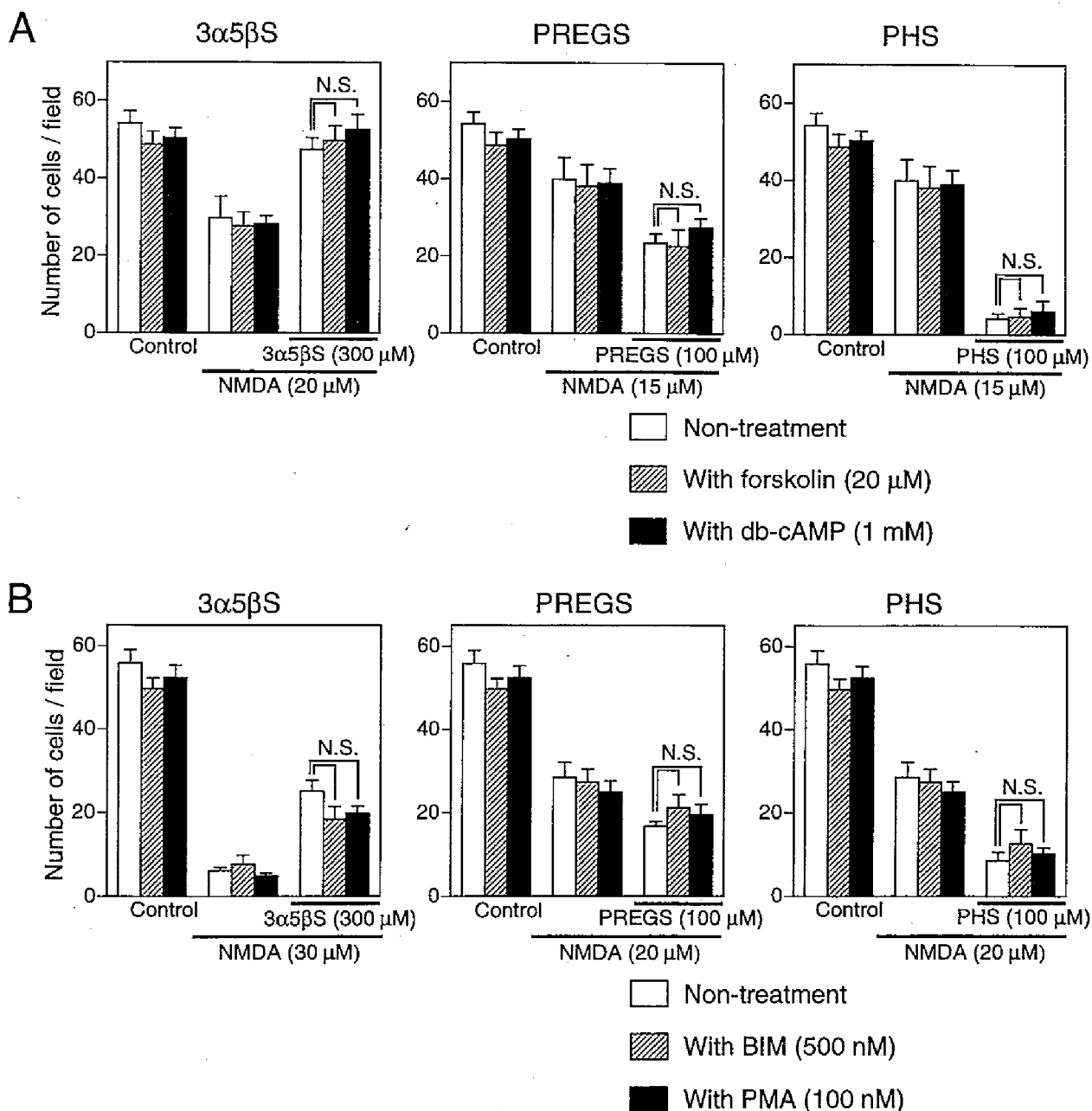


図1-7 3 α 5 β S、PREGSおよびPHSの細胞死調節作用に対する forskolin、db-cAMP、BIMおよびPMAの作用
 各ニューロアクティブステロイドおよびforskolin、db-cAMP (A) またはBIM、PMA (B) はNMDAと同時に24時間投与した。n = 5-6. N.S.; not significant.

初代分散培養大脳皮質神経細胞における3 α 5 β S、PREGSおよびPHSのグルタミン酸神経毒性に対する濃度依存的調節作用

以上の結果から、これら3種のステロイド化合物の作用はNMDA受容体の直接的な調節作用によることが推測されたので、次に分散培養系の大脳皮質神経細胞を用いて電気生理学的検討および細胞内Ca²⁺濃度増大応答に関する検討を行った。分散培養系においてこれら3種のステロイド化合物は、切片培養系とほぼ同様の作用を示した。すなわち3 α 5 β S (10-100 μ M)はグルタミン酸誘発神経細胞死を有意に抑制したが、PREGS (10-100 μ M) およびPHS (10-100 μ M)は逆にグルタミン酸誘発神経細胞死を有意に増強した (図1-8)。

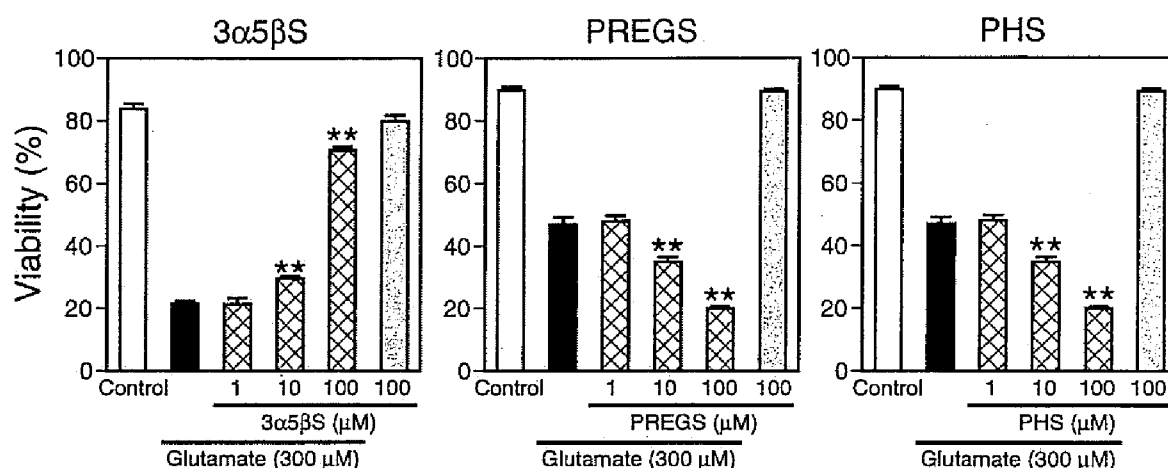


図1-8 グルタミン酸誘発神経細胞死に対する3 α 5 β S、PREGSおよびPHSの濃度依存的細胞死調節作用 ～初代分散培養大脳皮質神経細胞による検討～

各ステロイドはグルタミン酸と同時に1時間投与した。n = 5. ** P < 0.01 vs glutamate alone.

NMDA誘発電流応答に対するニューロアクティブステロイドの調節作用

電気生理学的検討によりNMDA受容体機能に及ぼす各ニューロアクティブステロイドの作用を検討した。1分間隔でNMDAを投与することにより濃度依存的に内向き電流が観察された。NMDA誘発電流はNMDA受容体の競合的拮抗薬であるD,L-AP-5 (50 μ M)の投与によりほぼ完全に消失した (図1-9A,B)。次に各ニューロアクティブステロイドの作用をNMDA投与の10秒前から投与することにより検討すると、3 α 5 β SはNMDA誘発電流を58%抑制し、逆にPHSは19%増強したが、PREGSは有意な作用を及ぼさなかった。3 α 5 β SおよびPHSの作用はいずれも可逆的であった (図1-9C,D)。

ニューロアクティブステロイドによるグルタミン酸誘発細胞内Ca²⁺濃度上昇調節作用

大脳皮質神経細胞におけるグルタミン酸誘発神経細胞死は、主にNMDA受容体を介して過剰に流入するCa²⁺が引き金となることが知られている [1,2,10]。そこで、グルタミン酸により誘発される細胞内Ca²⁺濃度増大応答に対する各ニューロアクティブステロイドの作用について検討した。細胞内へのCa²⁺流入量の指標としては細胞内Ca²⁺濃度の曲線下面積 (AUC) およびグルタミン酸投与直後のピーク値 (Peak amplitude) の2つを用いた。グルタミン酸 (100 μ M) 誘発細胞内Ca²⁺濃度増大応答はNMDA受容体遮断薬であるMK-801 (1 μ M)の投与により顕著に抑制されたことから、グルタミン酸により細胞内に流入するCa²⁺は主にNMDA受容体を介していることが示された。次に各ニューロアクティブステロイドの作用について検討したところ、3 α 5 β SはAUCおよびピーク値の両方を有意に減弱させたが、逆にPHSは有意に増強させた。一方、大脳皮質神経細胞において有意な細胞死増強作用が観察されたPREGSは、ピーク値を指標とすると有意な変化は認められないものの、AUCを指標とすることにより有意な増強作用を発現することが確認された (図1-10)。

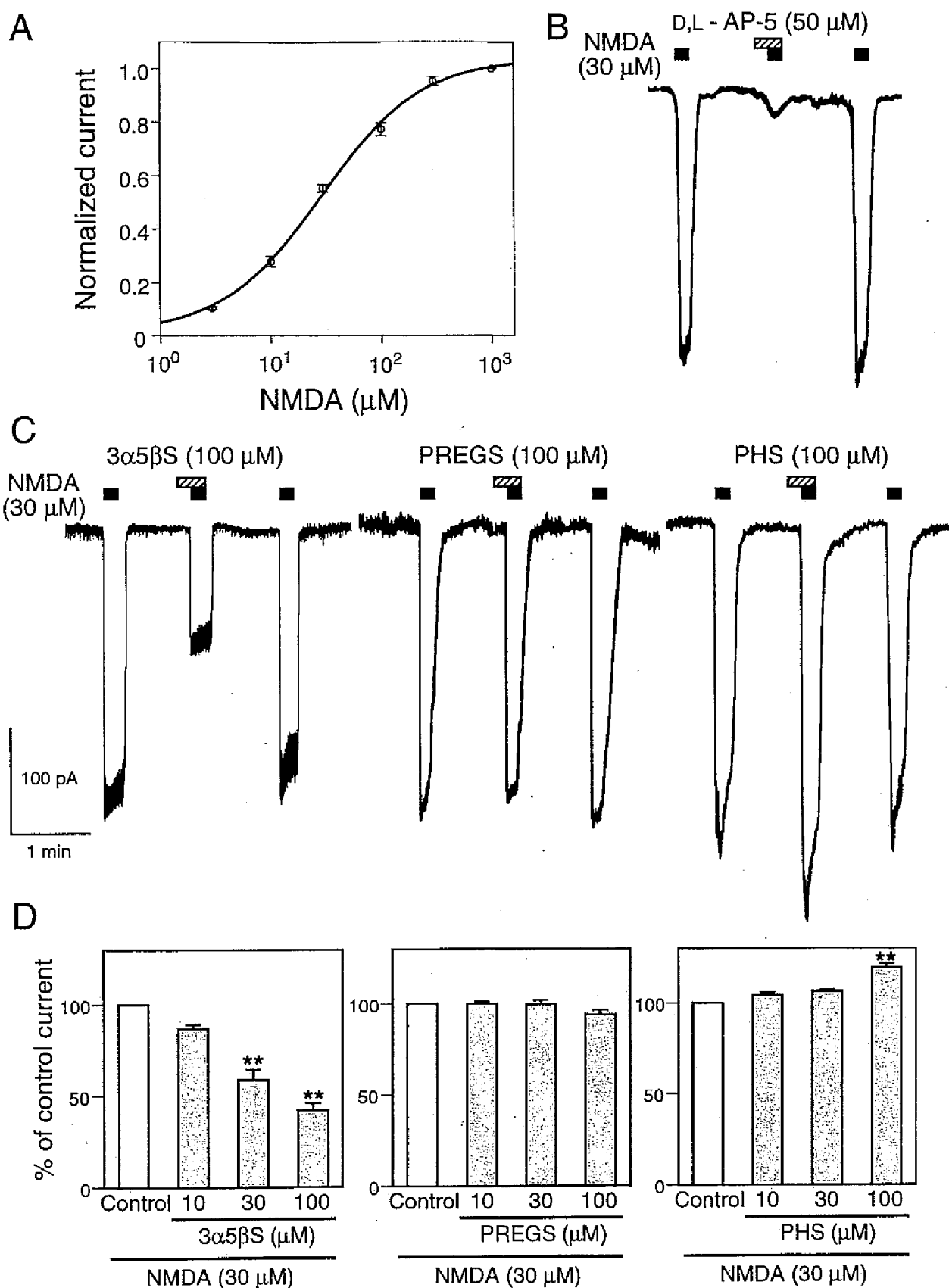
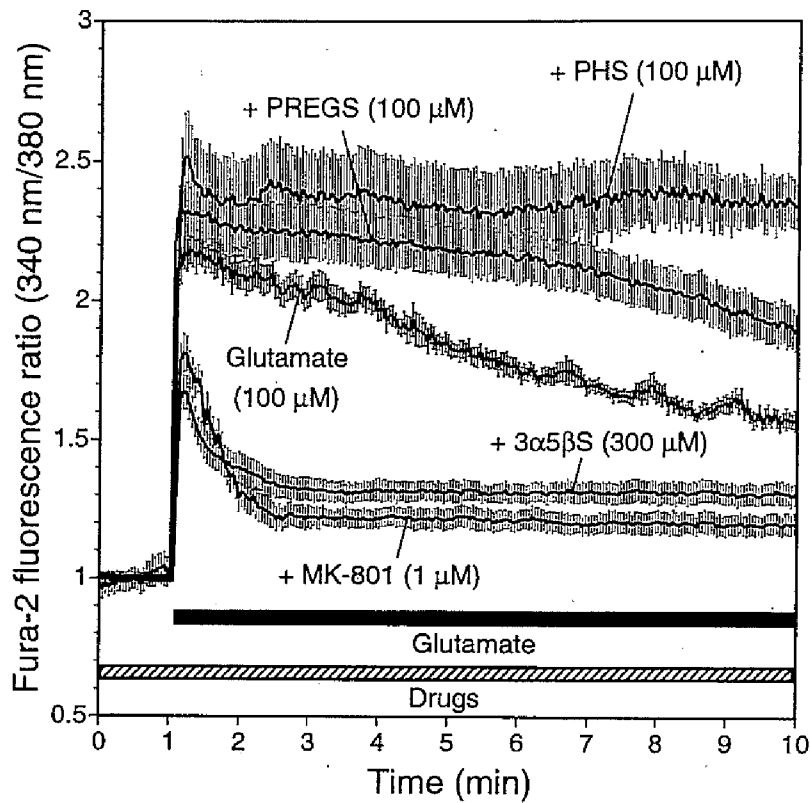


図 1-9 NMDA 誘発電流応答に対する $3\alpha 5\beta\text{S}$ 、PREGS および PHS の受容体機能調節作用
 NMDA 誘発電流応答の濃度依存性 (A) および D,L-AP-5 による競合的拮抗 (B)。 $3\alpha 5\beta\text{S}$ 、PREGS および PHS による NMDA 誘発電流応答に対する典型例 (C) および受容体機能調節作用 (D)。各ステロイド化合物は 10 秒間の前投与を行った後、NMDA と同時に投与した。(A) $n = 8$, (D) $n = 4-12$. ** $P < 0.01$ vs NMDA alone.

A



B

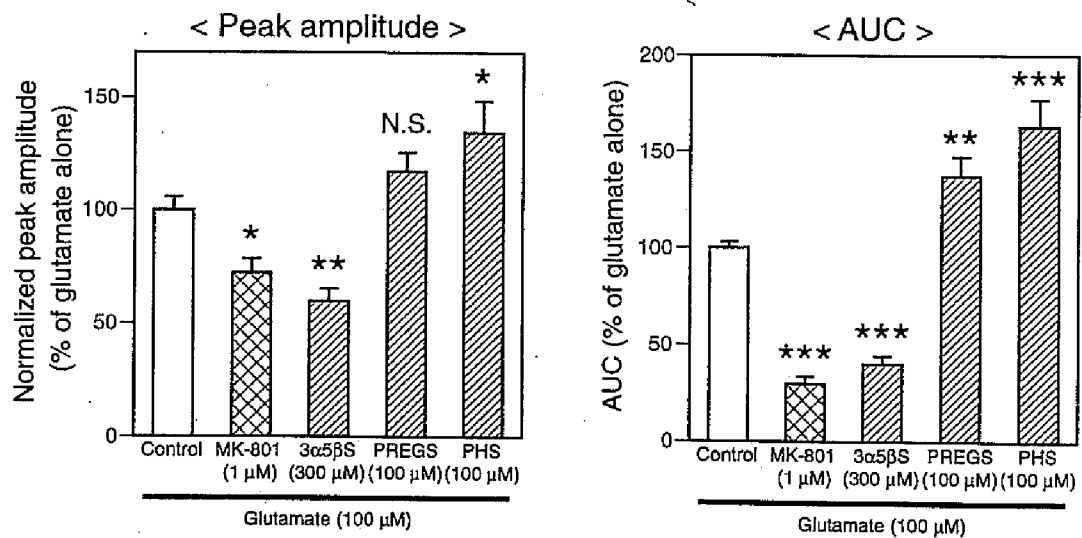


図1-10 グルタミン酸誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対する $3\alpha5\beta\text{S}$ 、PREGS および PHS の作用
 (A) 各ステロイドおよび MK-801 は記録開始時より投与し (hatched bar)、グルタミン酸は記録開始1分後から投与した (black bar)。(B) 細胞内への Ca^{2+} 流入量の指標として、グルタミン酸投与直後のピーク値 (Peak amplitude) および曲線下面積 (AUC) を用い、グルタミン酸単独投与群に対する値を100%として算出した。n = 6. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs glutamate alone, N.S.; not significant.

考 察

本研究により、培養大脳皮質神経細胞において、NMDA の投与により惹起される細胞死に対してニューロアクティブステロイドが顕著な影響を与えることが明らかとなった。検討した8種類のステロイド化合物の中で、 $3\alpha5\beta$ Sが濃度依存的に細胞死抑制作用を示したのに対して、PREGS およびその合成類似体である PHS は増悪作用を示した。これらの知見は、 $3\alpha5\beta$ S および $3\alpha5\beta$ S の合成類似体である pregnanolone hemisuccinate ($3\alpha5\beta$ HS) がラット海馬神経細胞において NMDA 誘発神経細胞死に対して保護効果を発揮した [84]、および PREGS がラット海馬神経細胞において NMDA 毒性を有意に増悪した [83,86] という報告と矛盾しない。他方、海馬神経細胞において興奮毒性に対する保護作用が報告されている DHEA および DHEAS は [33,34]、NMDA 誘発神経細胞死に対して有意な作用は及ぼさなかった。この矛盾については明らかではないが、DHEA および DHEAS の海馬神経細胞における保護作用はステロイド受容体に関連した作用を介して発現しており [33,34]、この知見を含めて考察すると我々の用いた大脳皮質切片培養系では、このようなステロイド受容体関連経路の活性が低かったことが要因であるのかもしれない。

脳内レベルの比較的高い pregnenolone [6,64] は NMDA 誘発神経細胞死に対して作用を及ぼさなかったが、PREGS および PHS が顕著な NMDA 誘発神経細胞死増強作用を示し、 $3\alpha5\beta$ S が細胞死抑制作用を示したという本研究結果は、ステロイド化合物の C3 位の置換基の立体配置または負電荷の有無、および C5-C6 間の二重結合の有無による平面構造の相違が NMDA 誘発神経細胞死に対する調節作用の違いの要因となるという以前の報告を支持するものである [83]。また、脳および脊髄の傷害の後にニューロアクティブステロイドの合成が増加すること [50]、および pregnanolone ($3\alpha5\beta$) が NMDA 誘発電流および神経細胞死に影響を与えない [83,84] という知見も含めて考察すると、ニューロアクティブステロイドの C3 位に硫酸基を付加する steroid sulfotransferase の活性または C3 位の硫酸基を除去する酵素である steroid sulfatase の活性の変化は傷害の発現の程度を大きく左右する可能性が推察される。

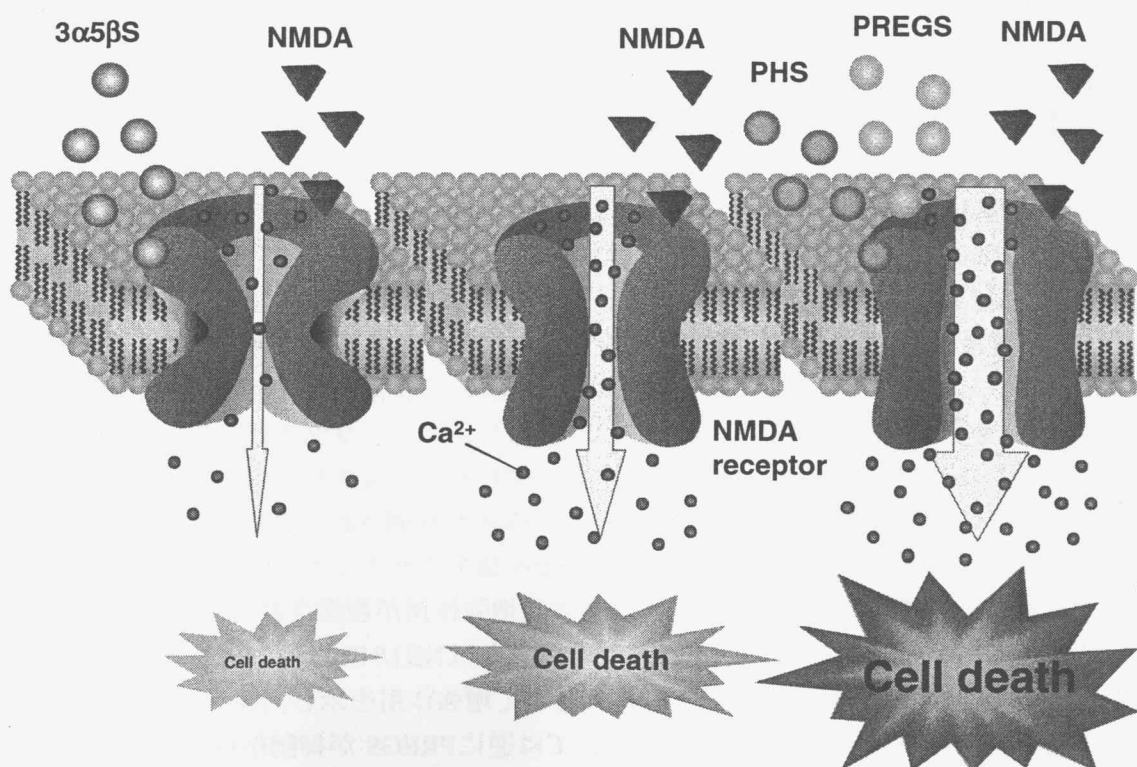


図 1-11 $3\alpha5\beta$ S、PREGS および PHS による NMDA 誘発神経細胞死に対する制御

ニューロアクティブステロイドの作用の発現には細胞質内ステロイド受容体への結合とタンパク合成誘導が関与することも示唆されているが[47,66,67]、cycloheximideがニューロアクティブステロイドの作用に有意な変化を及ぼさなかったことから、これらの作用にタンパクの *de novo* 合成は関与していないことが示唆された。また、ニューロアクティブステロイドはGABA_A受容体機能を抑制することによりウサギ腎近位尿細管細胞をミトコンドリア障害および低酸素により惹起される細胞死から保護することが報告されており[82]、さらに最近、DHEASがシグマ受容体の調節を介した作用により培養ラット海馬神経細胞死を減弱することが示された[40]。しかしながら、本研究においてはGABA_A受容体やシグマ受容体を遮断する薬物によってもニューロアクティブステロイドの調節作用は有意な影響を受けなかった。これらの結果から検討した3種のニューロアクティブステロイドのNMDA誘発神経細胞死に対する調節作用は、GABA_A受容体やシグマ受容体を介したシグナル機構を調節することにより発揮されている可能性は低いことが示された。

NMDA受容体の活性はPKAやPKCおよびSrc型チロシンキナーゼにより増強され[94]、そのリン酸化レベルはシナプス伝達の可塑性に関与することが示唆されている[45]。また、各種キナーゼによるリン酸化部位は細胞内に存在し、ニューロアクティブステロイドのNMDA受容体結合部位は細胞外に存在すると示唆されているが[28,60]、17 β -estradiolのカイニン酸誘発電流増強作用がPKA阻害薬で抑制されること[20]、およびallopregnanoloneのGABA誘発IPSCsに対する増強作用がPKC阻害薬で抑制されること[14]が報告されている。したがって、細胞内の受容体リン酸化レベルにより受容体タンパク自体の構造変化が起こり、ニューロアクティブステロイドの受容体への結合が調節されることにより、受容体機能調節作用が左右される可能性が考えられた。しかし、PKAやPKCの活性を制御する諸種の薬物はNMDA誘発神経細胞死や電流応答に対する3種のニューロアクティブステロイドの作用に影響を与えなかった。以上の結果から、これら3種のニューロアクティブステロイドによるNMDA誘発神経細胞死調節作用は、NMDA受容体タンパクにおける細胞質内標的部位のリン酸化レベルには影響されないことが示唆された。

電気生理学的検討において、NMDAにより誘発される電流に対するニューロアクティブステロイドの作用を検討したところ、3 α 5 β SはNMDA誘発電流を抑制し、逆にPHSは増強したが、PREGSは有意な作用を及ぼさなかった。また、グルタミン酸の投与により誘発される細胞内Ca²⁺濃度増大応答は、3 α 5 β Sの前処置によりAUCおよびピーク値の両方において有意に減弱されたが、逆にPHSによりAUCおよびピーク値のどちらも有意に増強された。これらの結果は、海馬神経細胞において3 α 5 β SおよびPHSが本研究結果と同様にNMDA応答を調節したという以前の報告を支持するものである[25]。一方、大脳皮質神経細胞において有意な細胞死増強作用が観察されたPREGSは、NMDA誘発電流応答に対して有意な増強作用は及ぼさなかった。この結果はPREGSが細胞内Ca²⁺濃度上昇のピーク値を顕著に増強するという以前の報告[25]と一致しない。しかし、YaghoubiらはPREGSの受容体機能増強作用の程度は発現しているNMDA受容体のサブユニット構成により異なり、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた再構成系においてNR1サブユニットと同時にNR2Aを発現させた場合に比べてNR2Bサブユニットを同時に発現させた場合ではPREGSの作用が減弱されること[93]を、CecconらはPREGSがNMDA受容体に対してアゴニストの解離を減少させるように働くこと、およびnativeの大脳皮質神経細胞ではPREGSのNMDA誘発電流増強作用が観察されにくいこと[9]を報告している。さらにMalayevらは、NR1/NR2A受容体またはNR1/NR2B受容体を発現している細胞においてはPREGSがNMDA誘発電流応答に対して増強作用を示し、NR1/NR2C受容体またはNR1/NR2D受容体を発現している細胞においては逆にPREGSが抑制作用を示すこと[44]を報告している。PREGSが細胞内Ca²⁺濃度測定実験においてピーク値を指標とすると有意な作

用は発揮しなかったが、AUCを指標とすると有意な増強作用を発揮したという本研究における結果は、電気生理学的検討結果と合わせて考えると、著者の用いている大脳皮質神経細胞標本はPREGSのピーク値に対する作用が観察されにくいサブユニット構成のNMDA受容体を発現していることを示唆している。

本研究では比較的高濃度 (10-300 μM) のニューロアクティブステロイドの作用を検討した。ラットやヒトの脳に存在するこれらステロイド化合物の通常生理的濃度は nM order のレベルであることが報告されているが[6,87]、progesteroneやそのA環が還元された代謝物は妊娠時などに血漿中レベルが通常状態の10-1000倍という高レベルに達することが報告されており[61]、神経細胞やグリア細胞によって局所的に生合成されるニューロステロイドが[22,35,96]、脳虚血やけいれん・うつなどの病態時に、脳内の微小環境において μM order のレベルに達する可能性も十分に考えられる。

結論として、NMDA受容体の過剰刺激により惹起される神経細胞死においてニューロアクティブステロイドは急性的にNMDA受容体機能を調節し、細胞外からの Ca^{2+} 流入を増強または抑制することにより、NMDA誘発神経細胞死に対して影響を及ぼすことが明らかとなった。

第二章

ニューロアクティブステロイドによる カイニン酸および AMPA 誘発神経細胞死に対する制御

グルタミン酸受容体の過剰刺激により惹起される神経細胞障害は興奮毒性と呼ばれており、脳虚血および種々の中枢神経変性疾患に深く関与することがよく知られている[1,48]。グルタミン酸受容体サブタイプのうち Ca^{2+} の透過性が非常に高い NMDA 受容体は、グルタミン酸神経毒性において中心的な役割を果たしていると考えられているが、カイニン酸または AMPA により活性化される non-NMDA 型受容体は、一部の病態条件下においては興奮性神経細胞死に重要な役割を果たすことが知られている [32,37,88]。Sheardown らは non-NMDA 受容体遮断薬である 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline (NBQX) が齧歯類の虚血モデルにおいて顕著な神経保護作用を示す一方で、NMDA 受容体の選択的遮断薬である MK-801 が有意な保護作用を示さないことを報告しており [71,72]、このことは non-NMDA 受容体の過剰な活性化もまた興奮性神経細胞死を惹起し得ることを示唆する。Non-NMDA 受容体を介した興奮性神経毒性はこの他にも低酸素、低グルコース、けいれん、外傷、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病およびアルツハイマー病などの広範囲な病態に伴う神経障害を媒介することが提唱されている [65,80,88]。したがって non-NMDA 受容体を介した興奮毒性から神経細胞を保護することはこれらの疾患における予防または治療戦略の一つとなる可能性がある。

中枢神経系において生合成され、その作用を発揮するニューロステロイドをはじめとするニューロアクティブステロイドは、中枢および末梢神経系において様々な生理学および薬理学的作用を及ぼすことが知られている [18,49,66]。しかしながら、PREGSをはじめとするニューロアクティブステロイドの non-NMDA 受容体を介した興奮性神経細胞死に対する作用についてはほとんど解明されていない。そこで著者は non-NMDA 受容体の過剰刺激により惹起される神経細胞死に対するニューロアクティブステロイドの作用を切片培養系および分散培養系の脳皮質神経細胞を用いて検討した。その結果、代表的なニューロアクティブステロイドのうちで PREGS および代表的な女性ホルモンである 17β -estradiol がカイニン酸または AMPA 誘発神経細胞死を減弱することを見出した。本章においては、新規知見である PREGS の作用について研究を進め、第一節においてはカイニン酸誘発神経細胞死に対する保護作用機序について、第二節においては AMPA 誘発神経細胞死に対する保護作用機序について解析を行った。

実験方法

試薬

本研究にて用いた試薬の購入元は、試薬名の後ろに括弧書きで記した。6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium salt (CNQX disodium salt)、cyclothiazide、 17β -estradiol、estrone-3-*O*-sulfamate (EMATE)、 γ -D-glutamylaminomethyl sulfonic acid (GAMS)、GYKI52466、H-89 hydrochloride、1-naphthylacetylspermine (NAS)、NBQX、picrotoxin、progesterone および 11β -[4-dimethylamino]phenyl- 17β -hydroxy- 17 -[1-propynyl]estra-4,9-dien-3-one (mifepristone; RU-486) は Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA) より購入した。(RS)-AMPA は Tocris Cookson (Bristol, UK) より、propidium iodide (PI) は和光純薬工業 (大阪) より購入した。第一章にて使用した試薬に関しては省略した。その他の記載のない試薬に関しては、すべてナカライテスク (京都) より購入した。

培養大脳皮質切片の調製及び維持

第一章実験方法と同様の方法で行った。

培養大脳皮質切片における薬物処置及びカイニン酸またはAMPA神経毒性の評価

無血清培地で24時間維持した培養切片を、カイニン酸またはAMPA及び各薬物を含んだ無血清培地を用いて24時間維持することにより薬物処置を行った。薬物の前処置は培養10-11日目より無血清培地で維持する際に薬物を24時間培地に添加することにより行った。

神経毒性はNissl染色、PIの取り込みおよびlactate dehydrogenase (LDH) release assayを指標として評価した。Nissl染色は第一章実験方法と同様の方法で行った。

PIは形質膜が破綻した細胞内へ取り込まれ、DNAに挿入されることにより蛍光を発することが知られており、後期アポトーシス細胞またはネクローシス細胞を検出する試薬として広く用いられている。PI (5 µg/ml) は無血清培地を用いて、カイニン酸神経毒性における検討の際はカイニン酸処置後に4時間負荷し、AMPA神経毒性における検討の際はAMPA処置と同時に24時間負荷した。負荷終了後、rhodamine filterを装着した倒立蛍光顕微鏡を用いて各切片の蛍光強度を測定した。蛍光イメージ画像はモノクロームCCDカメラ (C5985; 浜松ホトニクス、浜松) を用いて取得し、各切片の蛍光イメージ画像よりNIH image 1.62を用いて頭頂部大脳皮質における単位面積 (180 µm × 180 µm) 当たりの平均蛍光強度を算出した。NMDA (200 µM) の24時間処置によりほぼ全ての神経細胞が変性または脱落したと想定される切片における傷害をstandard injuryとして、各薬物を処置した切片の蛍光強度をstandard injuryの蛍光強度に対する百分率 (% of standard injury (PI)) で表すことにより神経毒性を評価した。

乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase; LDH) は生体内において糖がエネルギー代謝される際に働く酵素群の一つであるが、細胞が傷害を受けた際に細胞外へ漏出することから、その遊離量は細胞の傷害の程度に相関することが知られている。Cytotoxicity Detection LDH kit (極東製薬、東京) を用いてカイニン酸またはAMPAを24時間処置した後の培養上清におけるLDH遊離レベルを測定した。Kitに標準装備されている基質発色試薬溶液 (乳酸およびニトロブルーテトラゾリウムを含む) を10 mM phosphate buffered saline (PBS) にて3倍希釈したものを基準溶液として作製した。この基準溶液75 µlと培養上清25 µlを96 well plateを用いて混合し室温にて1時間反応させた。100 µlの1 N塩酸により反応を停止させた後、マイクロプレートリーダーを用いて570 nmの吸光度を測定した。NMDA (200 µM) 24時間処置群の切片における傷害をstandard injuryとして、各薬物を処置した切片の上清から得られた吸光度をstandard injuryの切片から得られた吸光度に対する百分率 (% of standard injury (LDH)) で表すことにより神経毒性を評価した。

初代分散培養大脳皮質細胞の調製及び維持

第一章実験方法と同様の方法で行った。

電気生理学

カイニン酸誘発電流に対するニューロアクティブステロイドの検討は第一章と同様の方法で行った。AMPA 誘発電流における検討は AxoGraph 4.6 を備えた personal computer に Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments, Union City, CA, USA) を接続して、ガラスパッチ電極 (抵抗値 3-5 M Ω) を使用して第一章と同様の方法で行った。

細胞内 Ca^{2+} 濃度測定

カイニン酸または各薬物は 1 ml/min の流速による灌流システムを用いて初代分散培養大脳皮質細胞に投与した。カイニン酸の投与時間は約 1 分間、投与間隔は約 7 分間とし、各薬物の適用は各薬物のみを含む緩衝液を約 1 分間適用した後、カイニン酸および各薬物を含む緩衝液を投与することにより行った。薬物のカイニン酸誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対する作用は、薬物適用時のカイニン酸誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇のピーク値を、薬物適用の直前および直後のカイニン酸単独投与時のピーク値の平均に対して百分率で算出することにより評価した。細胞に与える波長 340 nm および 380 nm の励起光は各々 5 秒間隔とし、他の実験方法は第一章実験方法と同様の方法で行った。

統計

データは全て、平均値 \pm 標準誤差で表した。培養大脳皮質切片の生存数を示したデータにおける統計処理は Student-Newmann-Keuls' test を用い、初代培養大脳皮質細胞における電気生理学的検討および細胞内 Ca^{2+} 濃度測定のデータにおいては paired *t*-test を用いた。全ての実験において危険率 5% 未満の時に統計学的な有意差があると判定した。

実験結果

第一節 カイニン酸誘発神経細胞死に対するニューロアクティブステロイドの作用

カイニン酸誘発神経細胞死の濃度依存性

大脳皮質切片培養においてカイニン酸により惹起される神経細胞死について検討した。培養10-11日目に切片を24時間無血清培地で維持した後、カイニン酸を24時間投与し、4日間のpostincubation後に神経毒性を評価したところ、著明な神経細胞死が観察され、その EC_{50} 値は $37.3 \mu M$ であった(図2-1,2)。

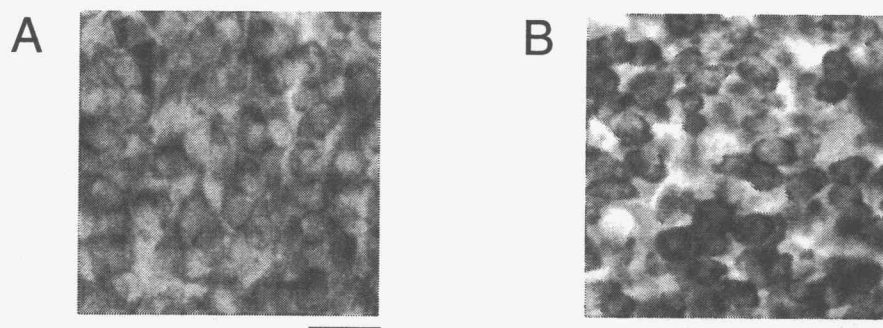


図2-1 培養大脳皮質切片におけるカイニン酸誘発神経細胞死の典型例

典型例の写真は各々(A) control、(B) カイニン酸 ($40 \mu M$) 処置群を表す。明確な輪郭を有しているNissl染色陽性細胞を生存細胞と同定した。カイニン酸は24時間投与し、その後4日間のpostincubationを行った。スケールバーは $20 \mu m$ を示す。

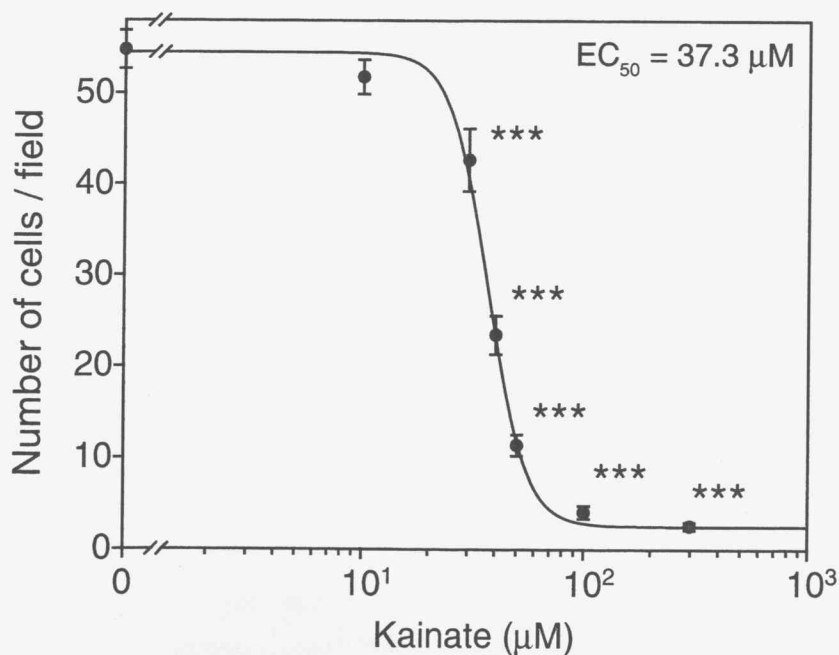


図2-2 カイニン酸誘発神経細胞死の濃度依存性

切片は培養10-11日目より無血清培地で24時間維持した後、カイニン酸 ($0-300 \mu M$) を24時間投与し、その後4日間のpostincubationを行った。縦軸は単位面積 ($80 \mu m \times 90 \mu m$) 当たりの顕微鏡観察による生存細胞数を、横軸はカイニン酸の処置濃度を示す。 $n = 11-12$. *** $P < 0.001$ vs control ($0 \mu M$ kainate)。

カイニン酸誘発神経細胞死に対する各種阻害薬の作用

次にカイニン酸誘発神経細胞死に対する各種受容体阻害薬の作用について検討した。カイニン酸神経毒性に対してNMDA受容体遮断薬であるMK-801 (10 μ M) および電位依存性Ca²⁺チャネル遮断薬であるnicardipine (20 μ M) は有意な作用を及ぼさなかった (図2-3A)。このことからこれらの受容体の二次的な活性化がカイニン酸誘発神経細胞死に対して関与している可能性は小さいことが示唆された。一方、non-NMDA受容体阻害薬であるCNQX (20 μ M) およびNBQX (20 μ M) はカイニン酸誘発神経細胞死をほぼ完全に抑制し、AMPA型グルタミン酸受容体選択的阻害薬であるGYKI52466 (30 μ M) [58]は有意ではあるが部分的にカイニン酸誘発神経細胞死に対して減弱作用を示した (図2-3B)。この作用はPIを用いた検討においても再現された (図2-3C)。このことからカイニン酸誘発神経細胞死はnon-NMDA受容体を介しており、カイニン酸受容体のみならず一部AMPA受容体も介していることが示唆された [57]。

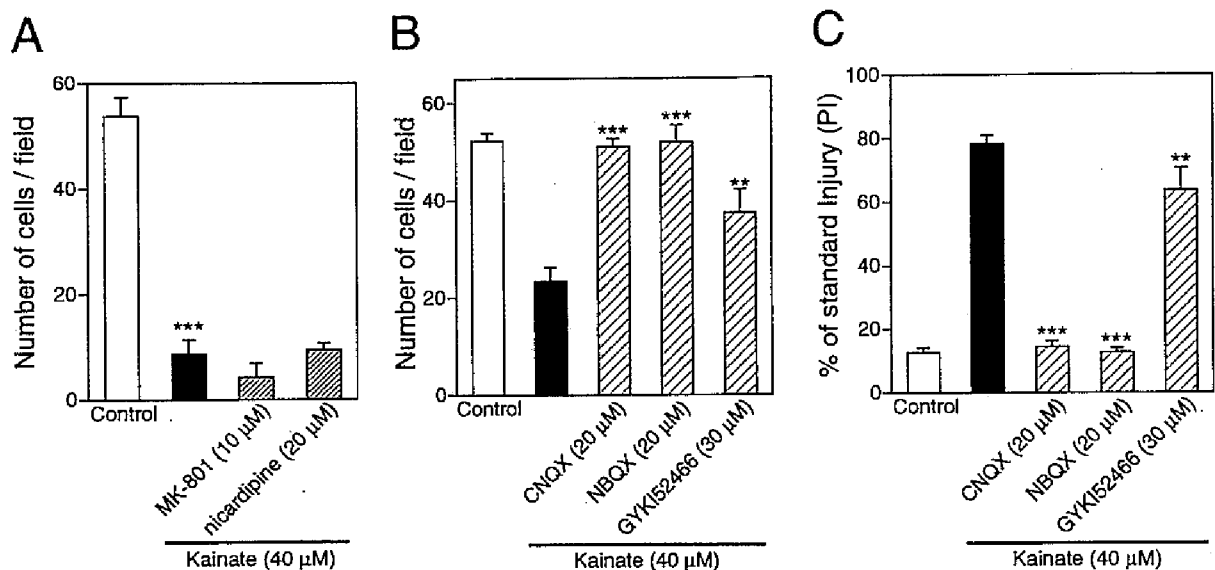


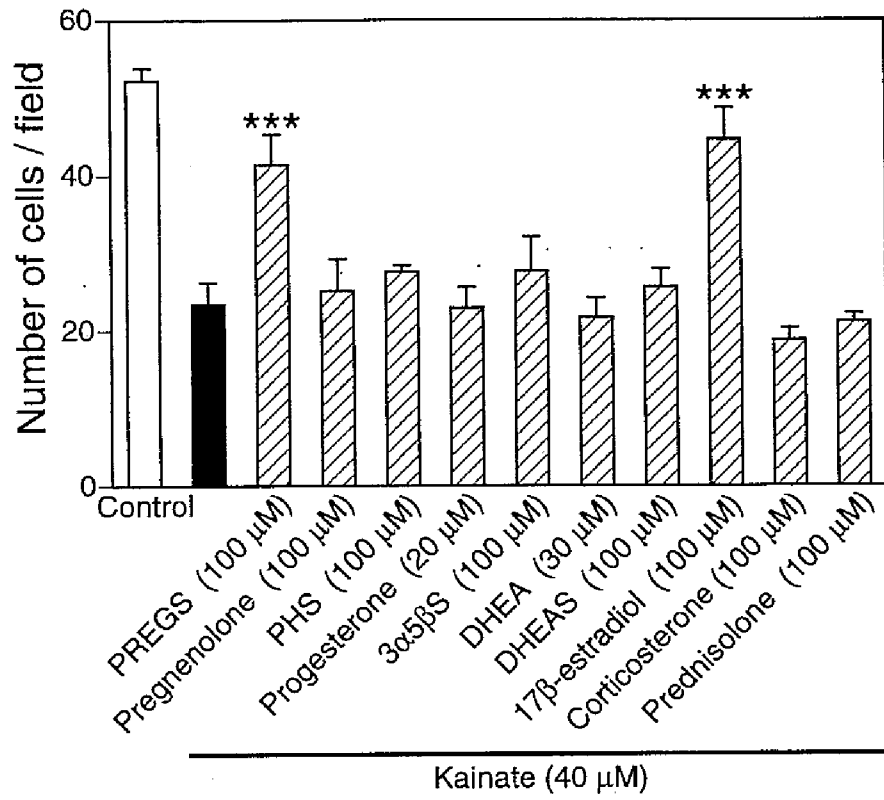
図 2-3 カイニン酸誘発神経細胞死に対する各種阻害薬の作用

薬物はカイニン酸と同時に24時間投与した。切片はカイニン酸処置後4日間のpostincubationを行ってからNissl染色を施した。PI観察による評価はカイニン酸処置終了後にPIを4時間適用してから行った。(A,B) Nissl染色による評価、(C) PI観察による評価。n = 10-12. *** P < 0.001 vs kainate alone.

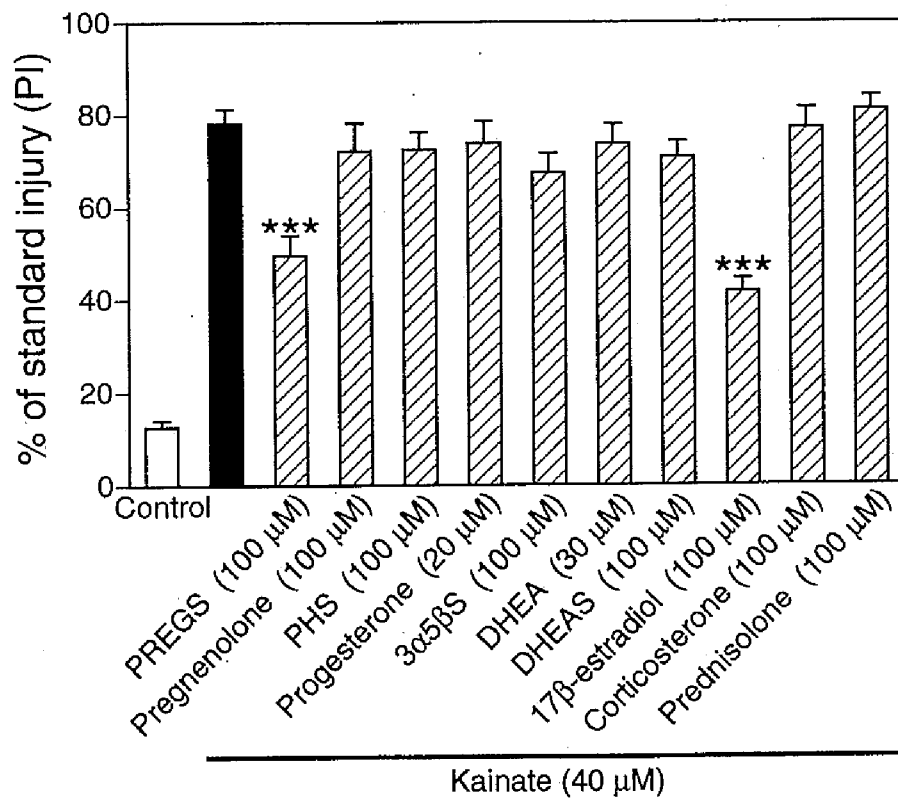
カイニン酸誘発神経細胞死に対するニューロアクティブステロイドの作用

代表的な10種類のニューロアクティブステロイドの作用について検討したところ、pregnenolone (100 μ M)、PHS (100 μ M)、progesterone (20 μ M)、3 α 5 β S (100 μ M)、DHEA (30 μ M)、DHEAS (100 μ M)、corticosterone (100 μ M) およびprednisolone (100 μ M) はカイニン酸との24時間の同時処置によってもカイニン酸誘発神経細胞死に対して有意な影響を及ぼさなかった。さらに、この結果はPI観察およびLDH release assayによる検討においても再現された (図2-4)。50 μ M以上の濃度のDHEAおよび30 μ M以上の濃度のprogesteroneは24時間の処置により切片培養系において単独毒性を示したためその作用を検討することはできなかった (data not shown)。一方、PREGS (100 μ M) および17 β -estradiol (100 μ M) は、カイニン酸誘発神経細胞死を顕著に抑制した (図2-4)。17 β -estradiolのカイニン酸誘発神経細胞死に対する保護作用に関しては既に報告がなされており [4]、以降の実験においては新規知見であったPREGSのカイニン酸神経毒性に対する保護作用に着目して検討を行った。

A



B



C

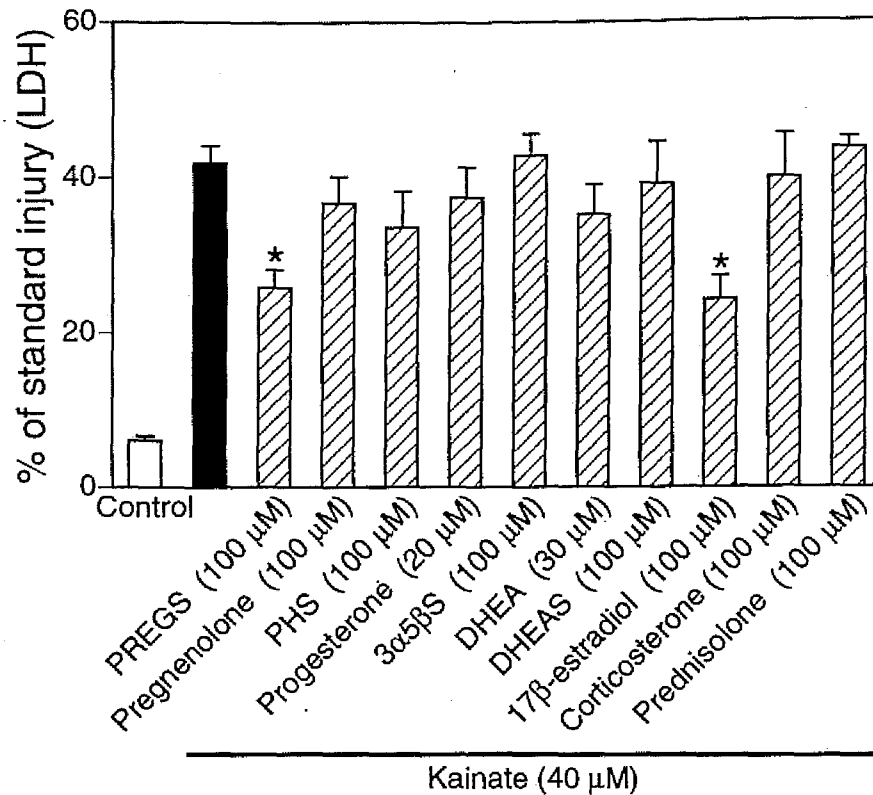


図 2-4 カイニン酸誘発神経細胞死に対する 10 種類のニューロアクティブステロイドの作用
薬物はカイニン酸と同時に 24 時間投与した。切片はカイニン酸処置後 4 日間の postincubation
を行ってから Nissl 染色を施した。LDH release assay は 24 時間のカイニン酸処置終了後に行い、
PI 観察による評価はカイニン酸処置終了後に PI を 4 時間適用してから行った。(A) Nissl 染色
による評価、 $n = 10-12$, (B) PI 観察による評価、 $n = 11-12$, (C) LDH release assay による評価、 n
 $= 5$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs kainate alone.

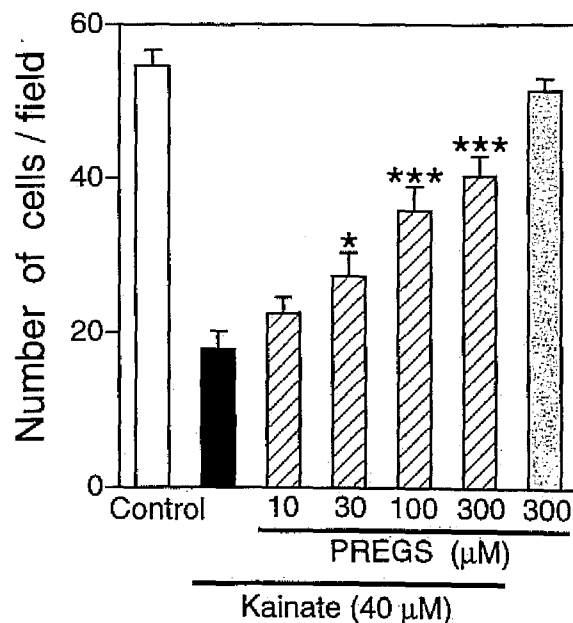


図 2-5 PREGS のカイニン酸誘発神経細胞死に対する濃度依存的保護作用
PREGS はカイニン酸と同時に 24 時間投与した。切片はカイニン酸処置後 4 日間の postincubation
を行ってから Nissl 染色を施した。 $n = 13-14$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs kainate alone.

カイニン酸誘発神経細胞死に対する PREGS の濃度依存的保護作用

PREGS のカイニン酸神経毒性に対する保護作用について検討したところ、PREGS は 30 μM から 300 μM の濃度範囲においてカイニン酸誘発神経細胞死を濃度依存的かつ顕著に抑制した (図 2-5)。次に PREGS の濃度を 100 μM に固定して、カイニン酸 (0-100 μM) に対する作用について検討した。その結果、PREGS はカイニン酸誘発神経細胞死の用量反応曲線を右方向へシフトさせ、 EC_{50} 値を 37.5 μM (95% 信頼区間 33.3-42.2 μM) から 46.5 μM (95% 信頼区間 43.8-49.4 μM) へと増加させた (図 2-6)。PREGS によるカイニン酸誘発神経細胞死に対する保護作用は 30 μM から 50 μM の濃度範囲において観察されたが、100 μM のカイニン酸 により惹起される神経細胞死に対しては有意な作用は及ばなかった (図 2-6)。

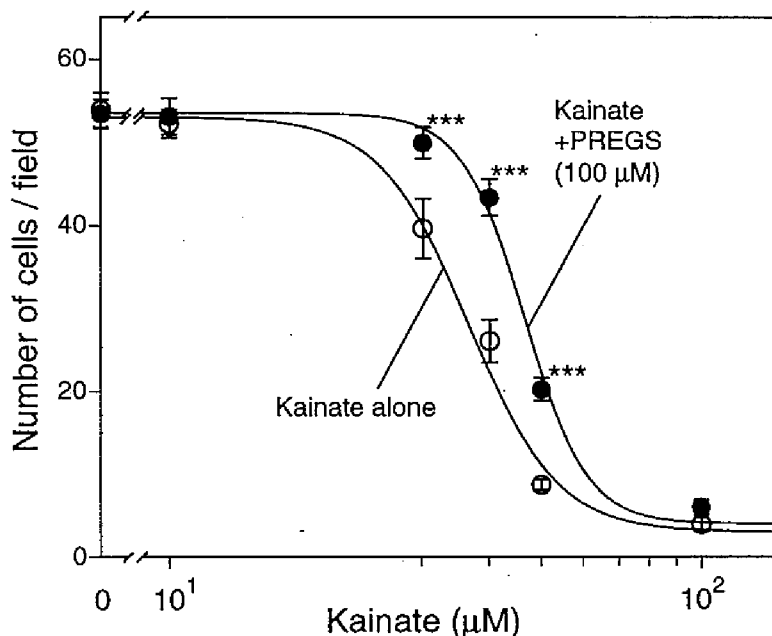


図 2-6 カイニン酸 (0-100 μM) 誘発神経細胞死に対する PREGS (100 μM) の保護作用
PREGS はカイニン酸と同時に 24 時間投与した。切片はカイニン酸処置後 4 日間の postincubation を行ってから Nissl 染色を施した。n = 11-14. *** $P < 0.001$ vs kainate alone, respectively.

PREGS によるカイニン毒性保護作用におけるステロイドサルファターゼ阻害薬の作用

脳組織内にはステロイドの硫酸基を除去する酵素であるステロイドサルファターゼが広く分布しており [26,70,77]、また顕著な保護作用を示す PREGS の脱硫酸体である pregnenolone がカイニン酸誘発神経細胞死に対して有意な作用を及ぼさないことから、外来的に培養切片に投与した PREGS がステロイドサルファターゼにより pregnenolone へと変換されることにより不活化されている可能性が考えられた。そこで、ステロイドサルファターゼの不可逆的阻害薬である EMATE [92] を PREGS と同時に適用して、カイニン酸誘発神経細胞死に対する作用について検討した。その結果 EMATE 単独適用ではカイニン酸神経毒性および細胞生存率に影響を与えなかったが、EMATE を PREGS と同時に添加することにより PREGS の保護作用が、より低濃度である 10 μM より観察された (図 2-7)。このことは内因性のステロイドサルファターゼ活性が PREGS の作用に影響を与えていることを示すものであり、さらに PREGS の C3 位の合成類似体である PHS がカイニン酸誘発神経細胞死に対して有意な作用を示さなかった結果も含めて考え合わせると、PREGS の保護作用の発現にはステロイド C3 位の置換基の負電荷の有無および炭素鎖数を含めた立体構造が重要であることが示唆された。

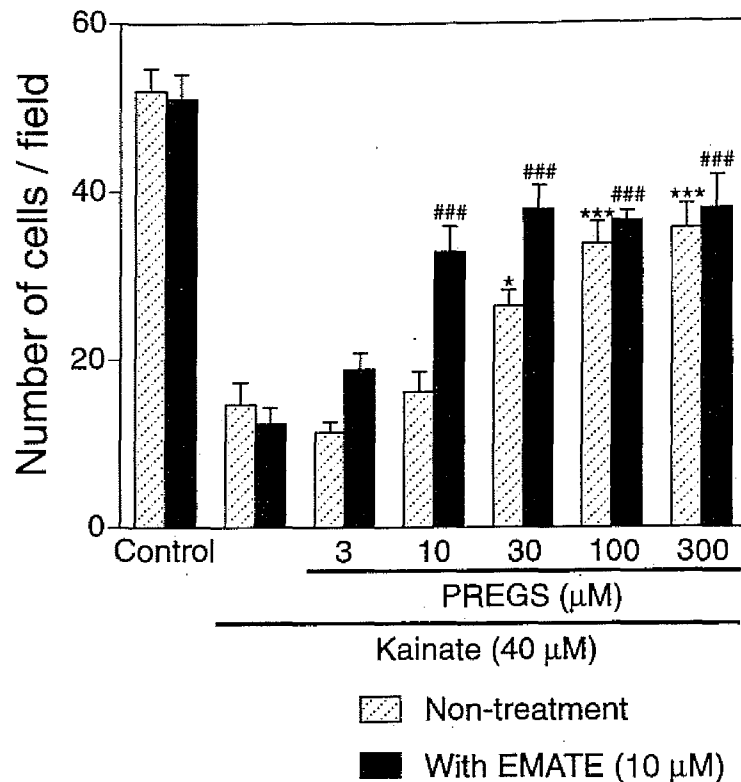


図2-7 PREGSのカイニン酸誘発神経細胞死に対する保護作用におけるステロイドサルファターゼ阻害薬の増強作用

PREGSおよびステロイドサルファターゼ不可逆的阻害薬であるEMATEはカイニン酸と同時に24時間投与した。切片はカイニン酸処置後4日間のpostincubationを行ってからNissl染色を施した。 $n = 10-13$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs kainate alone, ### $P < 0.001$ vs kainate with EMATE.

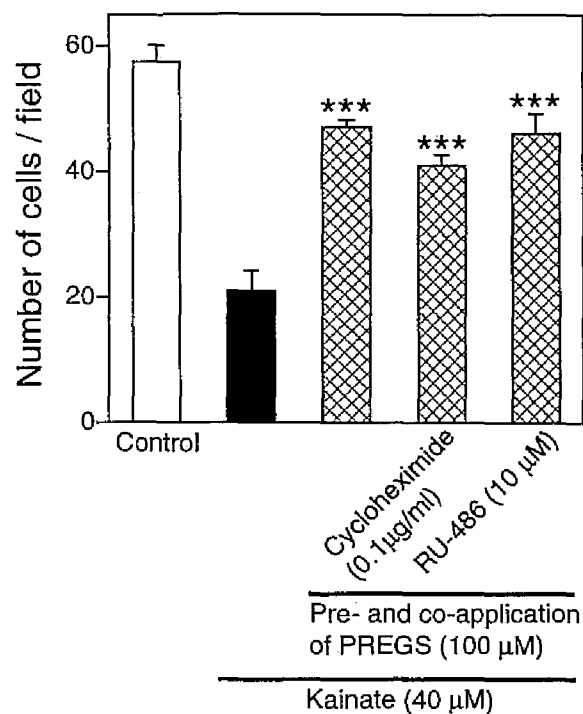
PREGSによるカイニン酸神経毒性保護作用機序の検討

ニューロアクティブステロイドの活性発現には、一般的なステロイドホルモンと同様に核内受容体を介する経路も存在することが知られている[47,66,67]。そこでPREGSと同時に核内progesterone受容体遮断薬であるRU-486 (10 μM) または、タンパク合成阻害薬であるcycloheximide (0.1 μg/ml) を添加してカイニン酸誘発神経細胞死に対する作用について検討したが有意な作用は観察されなかった(図2-8A)。このことからPREGSのカイニン酸神経毒性に対する保護作用の発現は核内受容体を介した経路には依存しないことが示唆された。

さらにPREGSはGABA_A受容体機能を顕著に抑制することから[41,59]、GABA_A受容体アンタゴニストであるpicrotoxin (100 μM) 存在下におけるPREGSの保護作用について検討したが、picrotoxinは有意な影響を与えなかった(図2-8B)。この結果より、カイニン酸誘発神経細胞死に対するPREGSの保護作用において、GABA_A受容体に関与している可能性を排除できることが示された。

カイニン酸受容体はPKAやPKCなどのキナーゼによりリン酸化による調節を受けることが知られており[13,63]、一部のニューロアクティブステロイドの神経伝達物質受容体に対する作用がPKAまたはPKCにより調節されることが報告されている[14,20]。そこで、アデニル酸シクラーゼの活性化薬であるforskolin (20 μM) およびPKA阻害薬であるH-89 (1 μM) 存在下におけるPREGSの保護作用について検討したが、有意な変化は観察されなかった(図2-8B)。さらに、PKCの活性化薬であるPMA (100 nM) およびPKC阻害薬であるBIM (500 nM) を用いて、同様に検討したが、有意な影響は確認できなかった(図2-8B)。

A



B

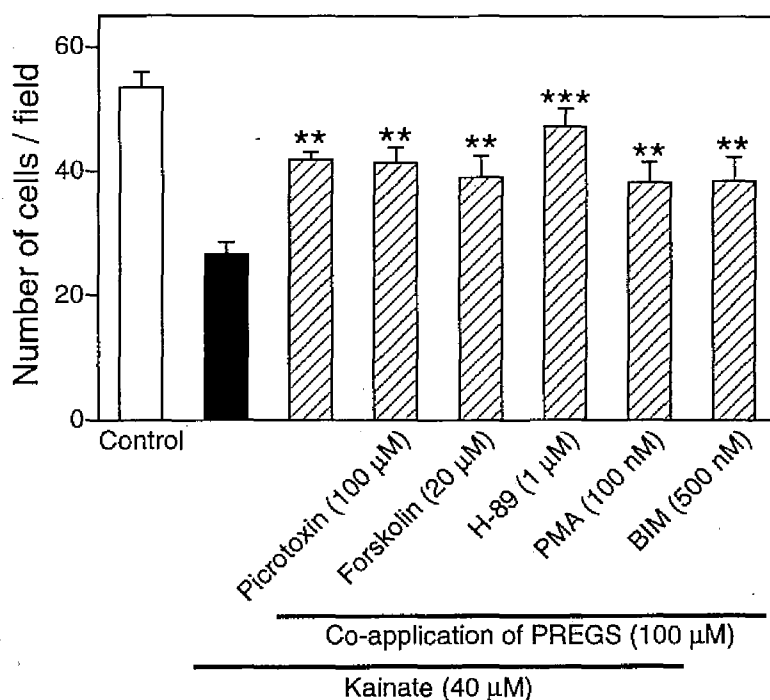
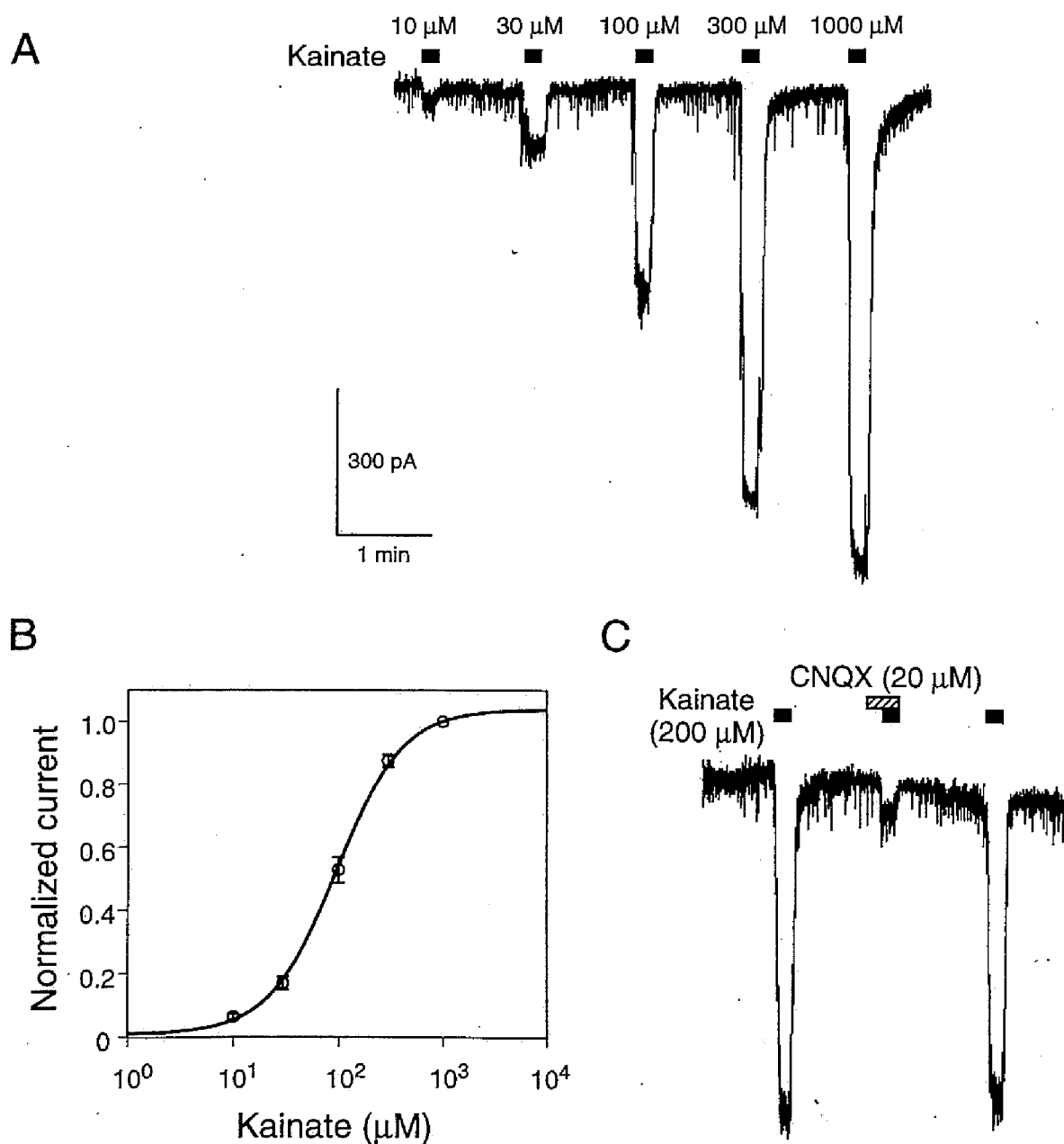


図 2-8 PREGS のカイニン酸毒性に対する保護作用における核内受容体、GABA_A 受容体および protein kinase の関与の検討

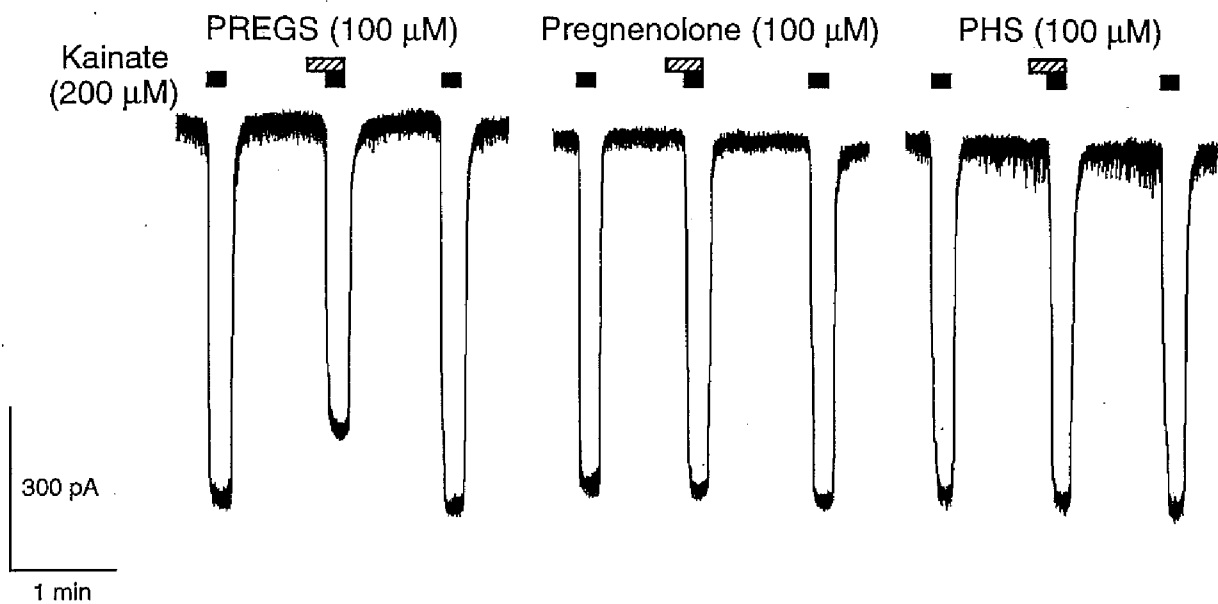
(A) Cycloheximide および RU-486 はカイニン酸処置の 24 時間前から同時まで PREGS と共に投与した (cross-hatched bar)。 (B) Picrotoxin, forskolin, H-89, PMA および BIM はカイニン酸および PREGS と同時に 24 時間投与した (hatched bar)。 $n = 11-14$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs kainate alone.

カイニン酸誘発電流応答に対する PREGS の抑制作用

カイニン酸受容体機能に及ぼすPREGSおよびその類縁体の作用をホールセルパッチクランプ法により検討した。カイニン酸 (10-1000 μM) を1分間隔で投与することにより濃度依存的に内向き電流が観察された (図2-9A,B)。以降の実験においてはカイニン酸の使用濃度は200 μM とした。カイニン酸誘発電流はnon-NMDA 受容体遮断薬であるCNQX (20 μM) の投与によりほぼ完全に消失したが (図2-9C)、NMDA 受容体遮断薬であるMK-801 (10 μM) の投与の影響は受けなかった。次にカイニン酸投与の10秒前からPREGSを投与することにより、PREGSのカイニン酸誘発電流に対する作用について検討すると、PREGS (30-300 μM) はカイニン酸誘発電流を濃度依存的に抑制した (図2-9D,E)。このPREGSによる抑制作用は細胞外液の灌流により wash out されたことから可逆的であることが示された。一方、PREGSのステロイドC3位の置換基だけが異なるpregnenoloneおよびPHSはカイニン酸誘発電流に対して有意な作用は及ぼさなかった (図2-9D,E)。これらの結果より、PREGSは特異的にカイニン酸受容体機能を抑制することが明らかとなった。



D



E

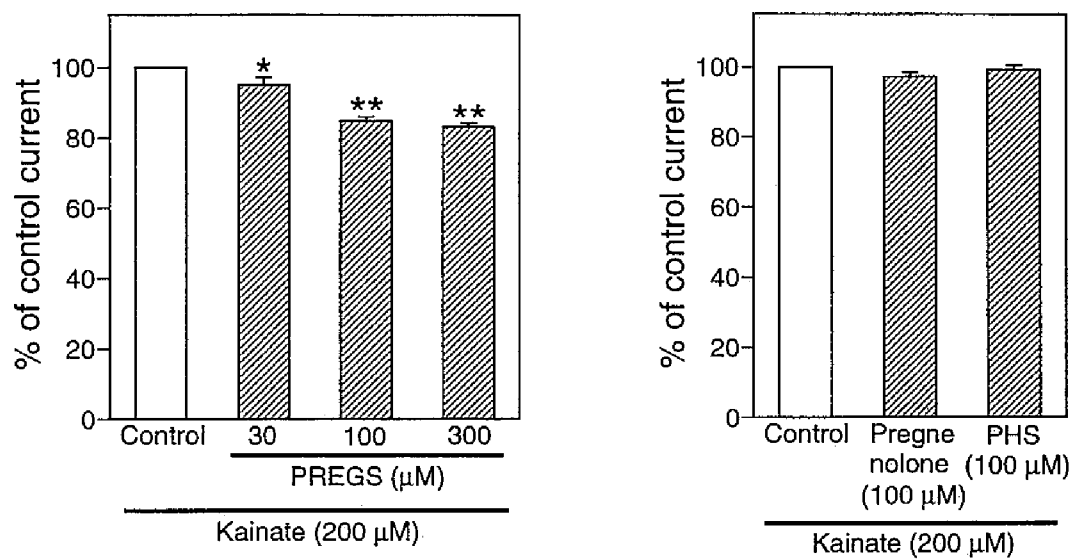


図 2-9 カイニン酸誘発電流応答に対する PREGS の特異的な受容体機能抑制作用

カイニン酸誘発電流応答の典型例 (A)、濃度依存性 (B) および CNQX による拮抗 (C)。PREGS、pregnenolone および PHS によるカイニン酸誘発電流応答に対する作用の典型例 (D) および PREGS による特異的な受容体機能抑制作用 (E)。各薬物は 10 秒間の前投与を行った後、カイニン酸と同時に 10 秒間投与した。(B) $n = 5$, (E) $n = 12$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs kainate alone.

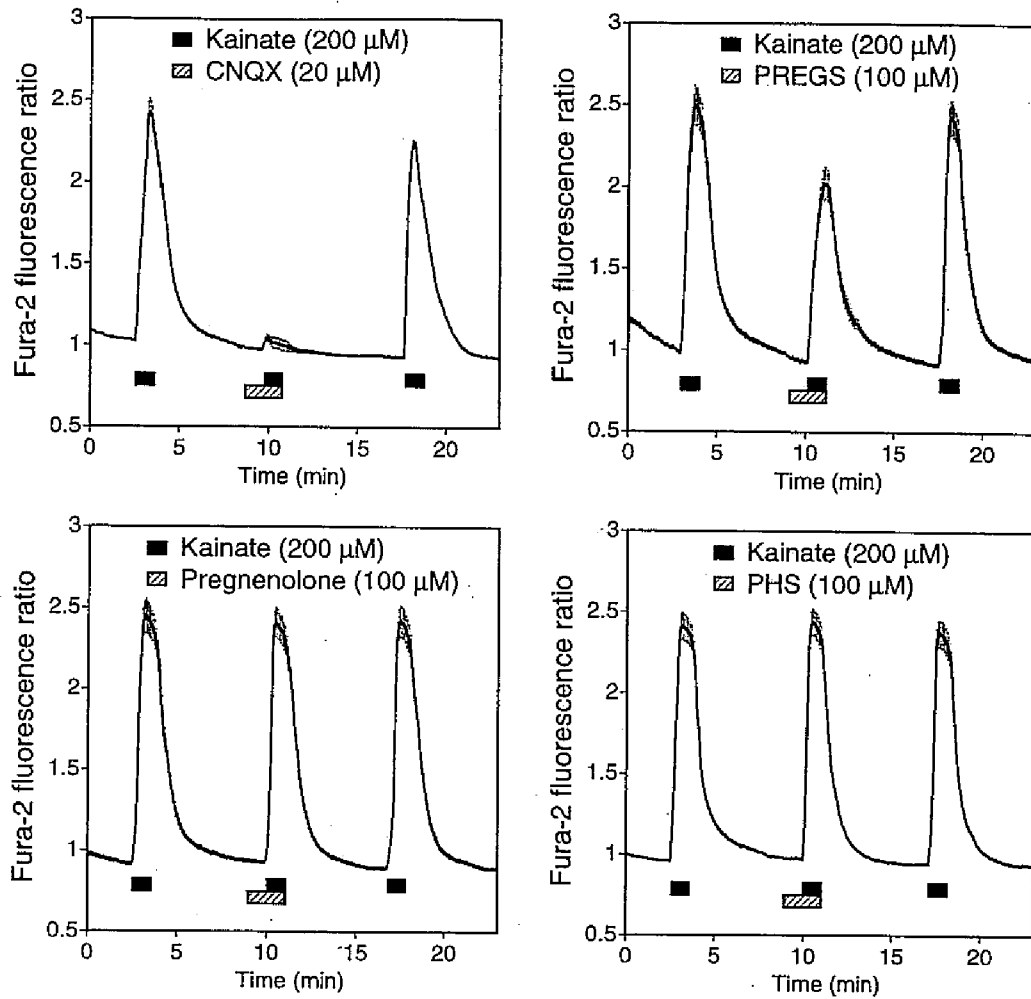
カイニン酸誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇における PREGS の抑制作用

PREGSのカイニン酸受容体機能に対する直接的な抑制作用についてさらに解析するため、カイニン酸により誘発される細胞内 Ca^{2+} 濃度増大応答に対するPREGSの作用について検討した。カイニン酸 (200 μM) を1分間灌流適用することにより一過性の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が誘発された、この細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は少なくとも30分間は安定して測定されるものの、そのピーク値はやや減衰する傾向が認められることから、薬物の作用を評価する際には薬物適用の前後に得られるカイニン酸単独投与時のピーク値の平均を用いた。

カイニン酸誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対してNMDA受容体遮断薬であるMK-801 (10 μM) および電位依存性 Ca^{2+} チャネル遮断薬であるnicardipine (20 μM) は有意な作用を及ぼさなかったことから、これらの受容体の二次的な活性化を介して細胞内へ流入する Ca^{2+} がカイニン酸誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に寄与している可能性は小さいことが示された。一方、non-NMDA受容体阻害薬であるCNQX (20 μM) はカイニン酸誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇をほぼ完全に抑制したことから (図2-10A,B)、non-NMDA受容体の活性化がカイニン酸誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に大きく寄与していることが示された。

次にPREGSおよびその類似体の作用について検討したところ、PREGS (100 μM) はカイニン酸誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を有意に抑制したのに対して、ステロイドC3位の置換基のみが異なるpregnenoloneおよびPHSはカイニン酸誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対して有意な作用は及ぼさなかった (図2-10A,B)。以上の結果はこれらのニューロアクティブステロイドのカイニン酸神経毒性に対する結果と一致しており、PREGSはカイニン酸誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を抑制することによりカイニン酸誘発神経細胞死を減弱することが明らかとなった。

A



B

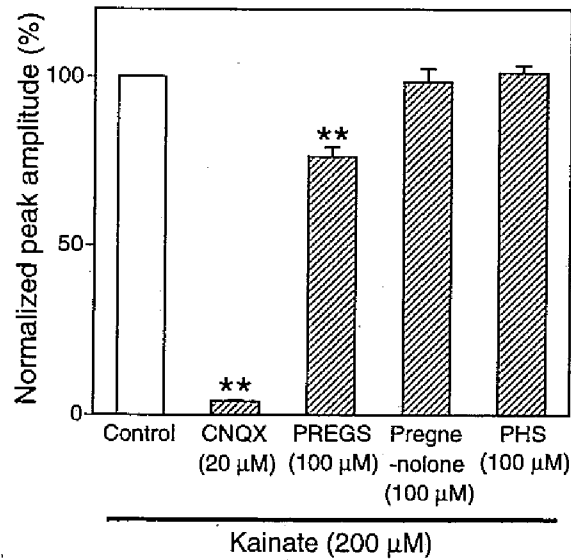


図2-10 カイニン酸誘発細胞内Ca²⁺濃度上昇に対するCNQX、PREGS、pregnenoloneおよびPHSの作用

(A) 各ステロイド化合物および薬物はカイニン酸投与の1分前から同時まで灌流システムにより適用した。(B) 薬物のカイニン酸誘発細胞内Ca²⁺濃度上昇に対する作用は、薬物適用時のピーク値を薬物適用の直前および直後のカイニン酸単独投与時のピーク値の平均に対して百分率で算出することにより評価した。n = 63-70. ** $P < 0.01$ vs kainate alone.

第二節 AMPA誘発神経細胞死に対するニューロアクティブステロイドの作用

AMPA 誘発神経細胞死の濃度依存性

Non-NMDA 受容体のもう一種類のサブタイプである AMPA により惹起される神経細胞死について大脳皮質切片培養を用いて検討した。培養 10-11 日目から無血清培地で維持した後、AMPA を 24 時間投与したところ、著明な神経細胞死が観察され、その EC_{50} 値は $23.7 \mu M$ であった (図 2-11,12)。

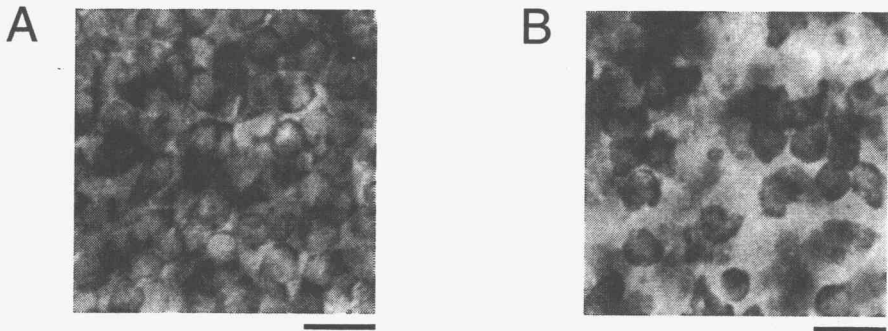


図 2-11 培養大脳皮質切片における AMPA 誘発神経細胞死の典型例
典型例の写真は各々 (A) control、(B) AMPA ($40 \mu M$) 処置群を表す。明確な輪郭を有している Nissl 染色陽性細胞を生存細胞と同定した。AMPA を 24 時間投与した後 Nissl 染色を行った。スケールバーは $20 \mu m$ を示す。

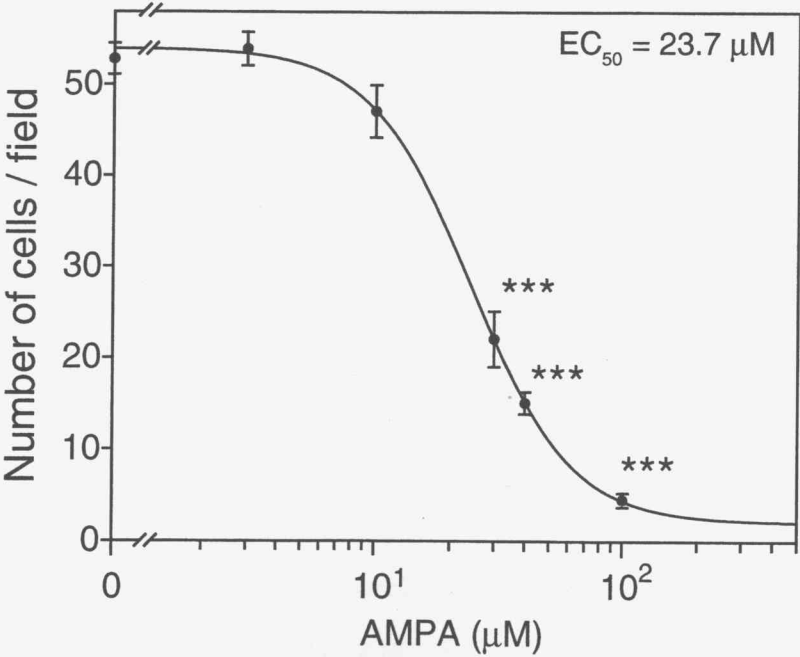


図 2-12 AMPA 誘発神経細胞死の濃度依存性
切片は培養 10-11 日目より無血清培地で 24 時間維持した後、AMPA ($0-100 \mu M$) を 24 時間投与した。縦軸は単位面積 ($80 \mu m \times 90 \mu m$) 当たりの顕微鏡観察による生存細胞数を、横軸は AMPA の処置濃度を示す。n = 11-12. *** $P < 0.001$ vs control ($0 \mu M$ AMPA)。

AMPA 誘発神経細胞死に対する各種阻害薬の作用

AMPA誘発神経細胞死に対する各種受容体またはイオンチャネル阻害薬の作用についてNissl染色およびPIの取り込みを指標にして検討した。Non-NMDA受容体阻害薬であるNBQX (20 μ M) およびAMPA受容体選択的阻害薬であるGYKI52466 (100 μ M) [58] はAMPA誘発神経細胞死をほぼ完全に抑制した(図2-13A,C)。一方、カイニン酸受容体に比較的选择性の高い拮抗薬であるGAMS (100 μ M) [95]、NMDA受容体遮断薬であるMK-801 (10 μ M)、電位依存性Ca²⁺チャネル遮断薬であるnicardipine (20 μ M)およびCa²⁺透過性AMPA受容体選択的拮抗薬であるNAS (100 μ M) [38] は有意な作用を及ぼさなかったことから(図2-13B,D)、これらの受容体またはイオンチャネルの二次的な活性化がAMPA神経毒性に関与している可能性は小さいことが示唆された。AMPA受容体の脱感作阻害薬であるcyclothiazide (30 μ M) はAMPA誘発神経細胞死を有意に増強した。これらの作用はLDH release assayを指標にした検討においても再現された。以上の結果からAMPA誘発神経細胞死は主にnon-NMDA受容体、特にCa²⁺非透過性のAMPA受容体を介して惹起されていることが示された。

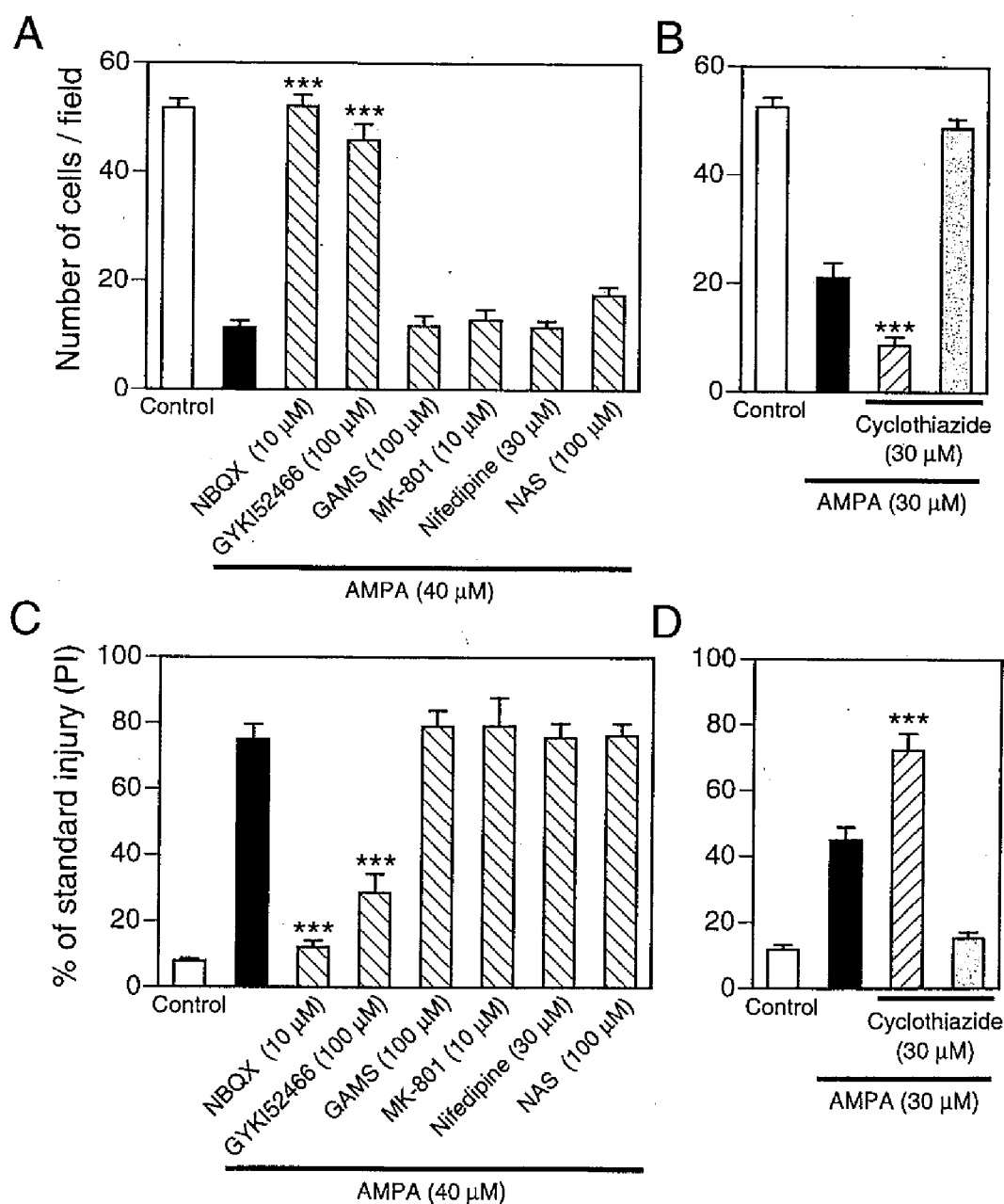
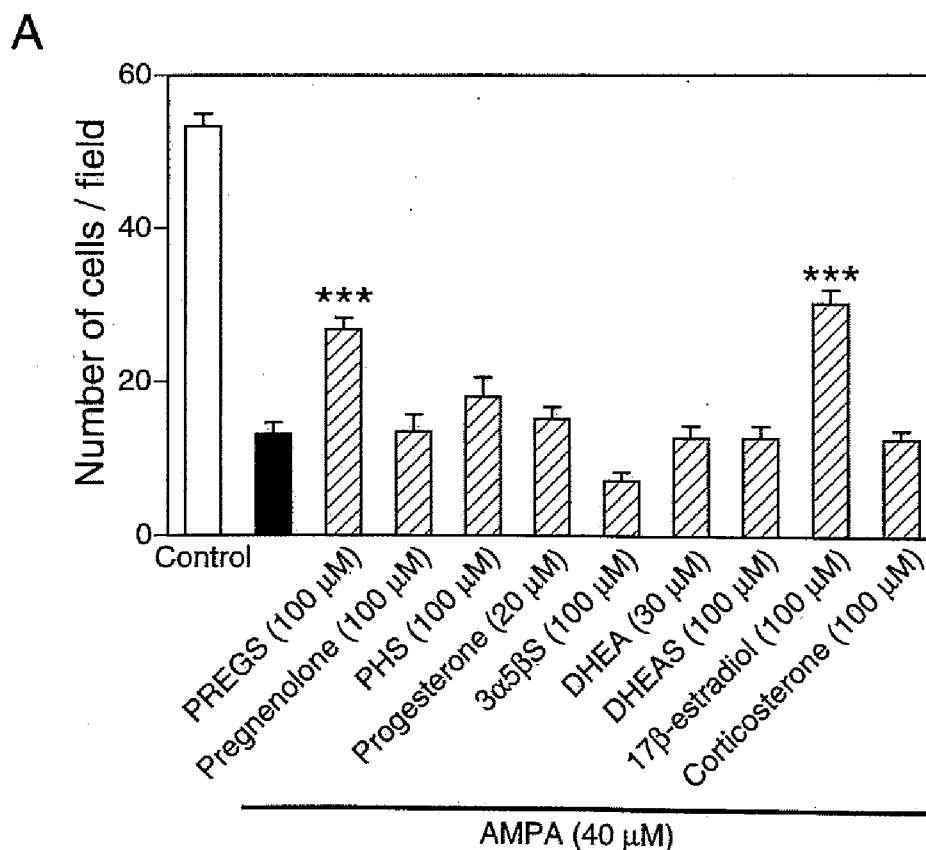


図 2-13 AMPA 誘発神経細胞死に対する各種阻害薬の作用 (前頁)

切片は AMPA 処置後に PI 観察を行ってから Nissl 染色を施した。(A,C) Nissl 染色による評価、(B,D) PI 観察による評価。n = 10-12. *** $P < 0.001$ vs AMPA alone.

AMPA 誘発神経細胞死に対するニューロアクティブステロイドの作用

代表的な9種類のニューロアクティブステロイドのAMPA誘発神経細胞死に対する作用について検討したところ、pregnenolone (100 μ M)、PHS (100 μ M)、progesterone (20 μ M)、progesterone (20 μ M)、 $3\alpha5\beta$ S (100 μ M)、DHEA (30 μ M)、DHEAS (100 μ M) およびcorticosterone (100 μ M) はAMPAとの24時間の同時処置を行ってもAMPA誘発神経細胞死に対して有意な影響を及ぼさなかった (図2-14A)。50 μ M以上の濃度のDHEAおよび30 μ M以上の濃度のprogesteroneは24時間の処置により切片培養系において単独毒性を示したためその作用を検討することはできなかった。一方、PREGS (100 μ M) および 17β -estradiol (100 μ M) は、AMPA 誘発神経細胞死を顕著に抑制した (図2-14A)。これらのニューロアクティブステロイドの作用はPIの取り込み (図2-14B) およびLDH release assay (図2-14C) を指標にした検討においても再現された。以降の実験においてはカイニン酸誘発神経細胞死における検討と同様に新規の知見であるPREGSのAMPA神経毒性に対する保護作用に着目して検討を行った。



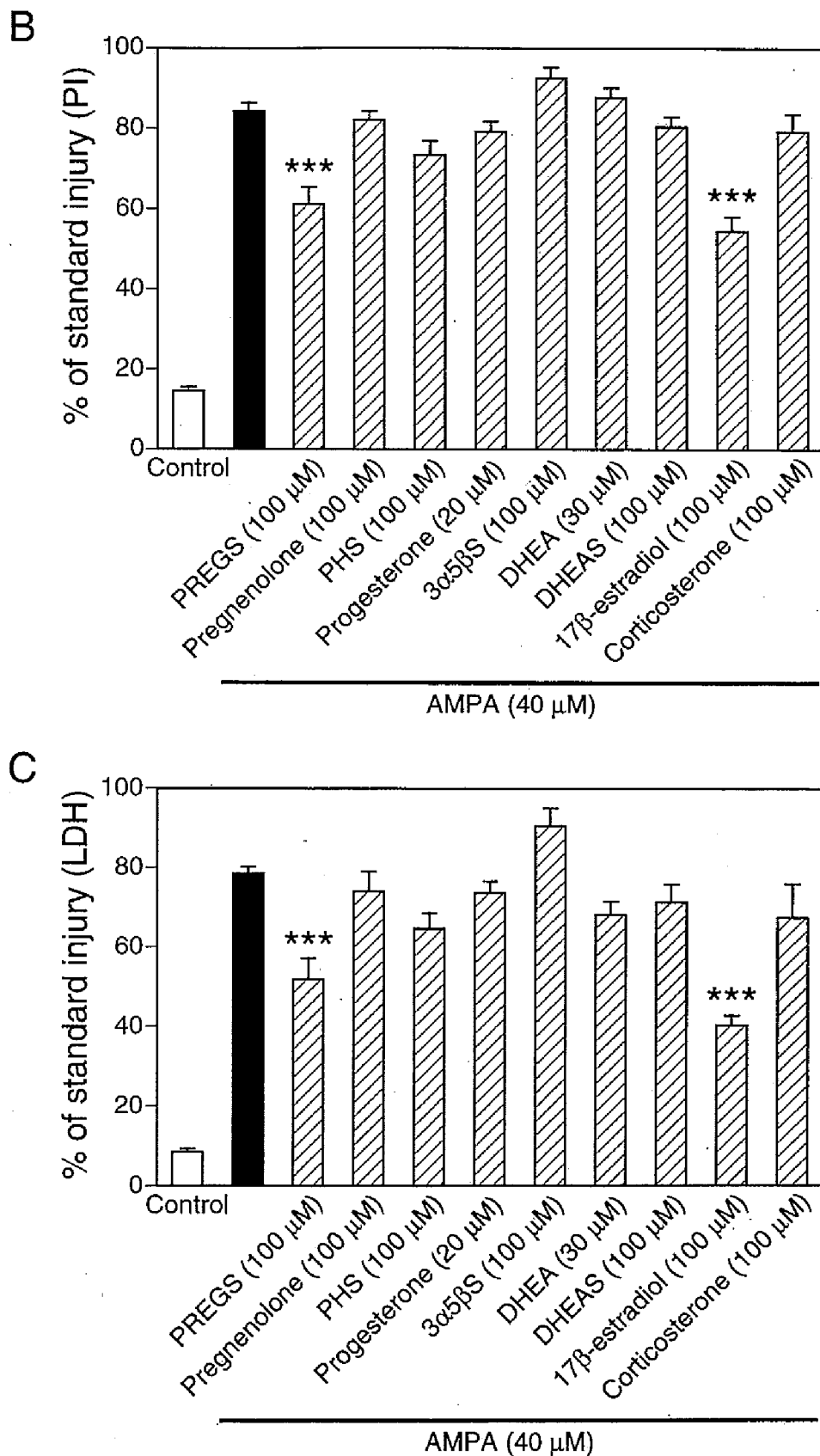


図 2-14 AMPA 誘発神経細胞死に対する 9 種類のニューロアクティブステロイドの作用
薬物は AMPA と同時に 24 時間投与した。切片は AMPA 処置後に PI 観察を行ってから Nissl 染色を施した。LDH release assay は AMPA 処置後の培養上清を用いて行った。(A) Nissl 染色による評価、 $n = 12$, (B) PI 観察による評価、 $n = 10-12$, (C) LDH release assay による評価、 $n = 3$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs AMPA alone.

AMPA 誘発神経細胞死に対する PREGS の濃度依存的保護作用

PREGS の AMPA 神経毒性に対する保護作用についてさらに検討したところ、Nissl 染色 (A) および PI 観察 (B) を指標とした評価では 30 μM から 300 μM の濃度範囲において、LDH release assay (C) による評価では 100 μM から 300 μM の濃度範囲において、PREGS は AMPA 誘発神経細胞死を濃度依存的かつ顕著に抑制した (図 2-15)。

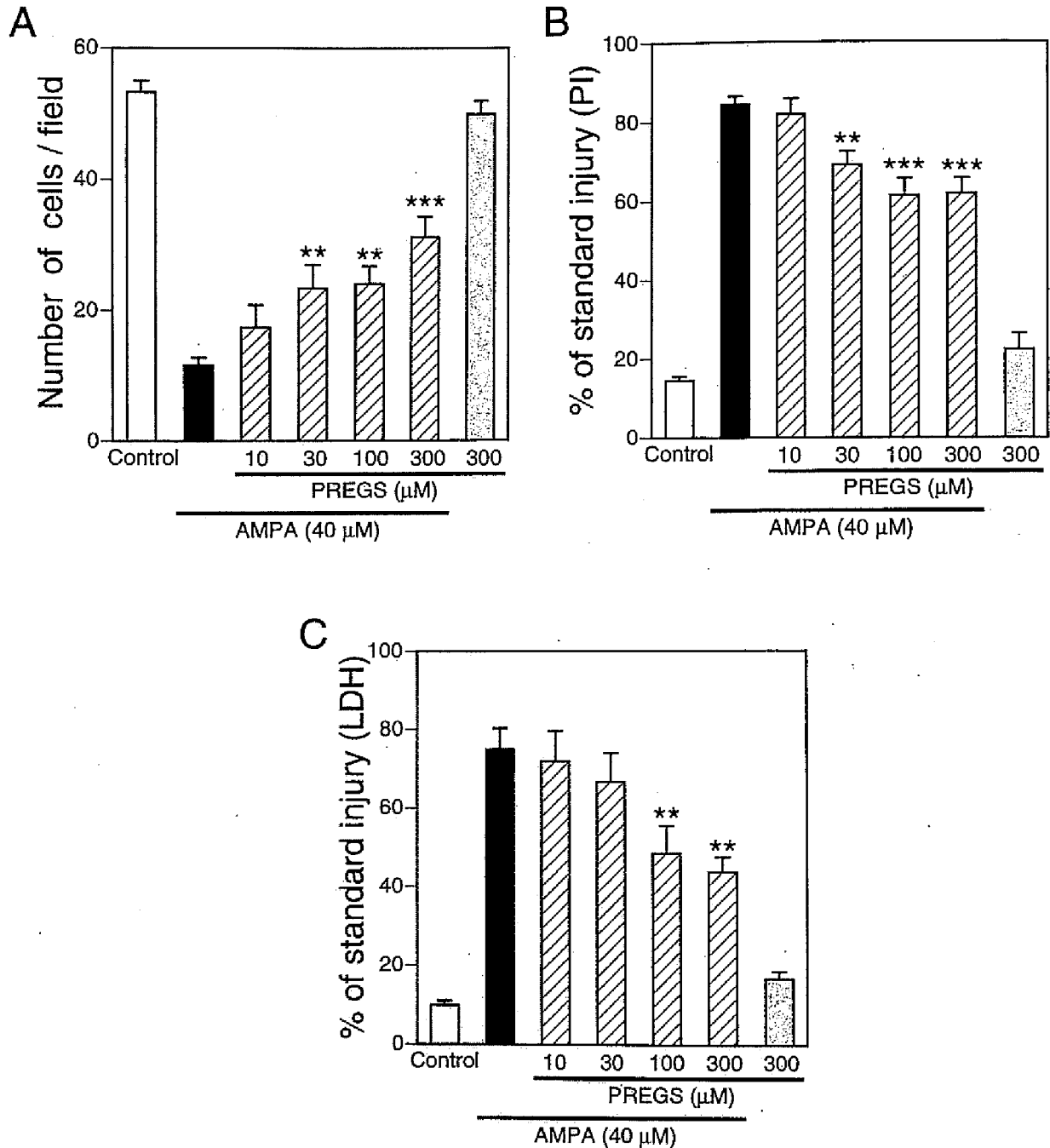


図 2-15 AMPA 誘発神経細胞死に対する PREGS の濃度依存的保護作用

PREGS は AMPA と同時に 24 時間投与した。切片は AMPA 処置後に PI 観察を行ってから Nissl 染色を施した。LDH release assay は AMPA 処置後の培養上清を用いて行った。(A) Nissl 染色による評価、 $n = 12$, (B) PI 観察による評価、 $n = 10-12$, (C) LDH release assay による評価、 $n = 7$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs AMPA alone.

PREGSによるAMPA毒性保護作用におけるステロイドサルファターゼ阻害薬の増強作用

次にカイニン酸神経毒性における検討の際と同様に、PREGSの保護作用におけるステロイドサルファターゼ不可逆的阻害薬であるEMATE [92]の作用について検討した。その結果、EMATEをPREGSと同時に添加することによりAMPA誘発神経細胞死に対するPREGSの保護作用が、より低濃度である10 μ Mより観察された(図2-16)。この結果は、内因性のステロイドサルファターゼ活性がPREGSを保護作用の観察されないpregnenoloneに変換することにより、AMPA誘発神経細胞死に対するPREGSの保護作用に影響を与えていることを示すものである。

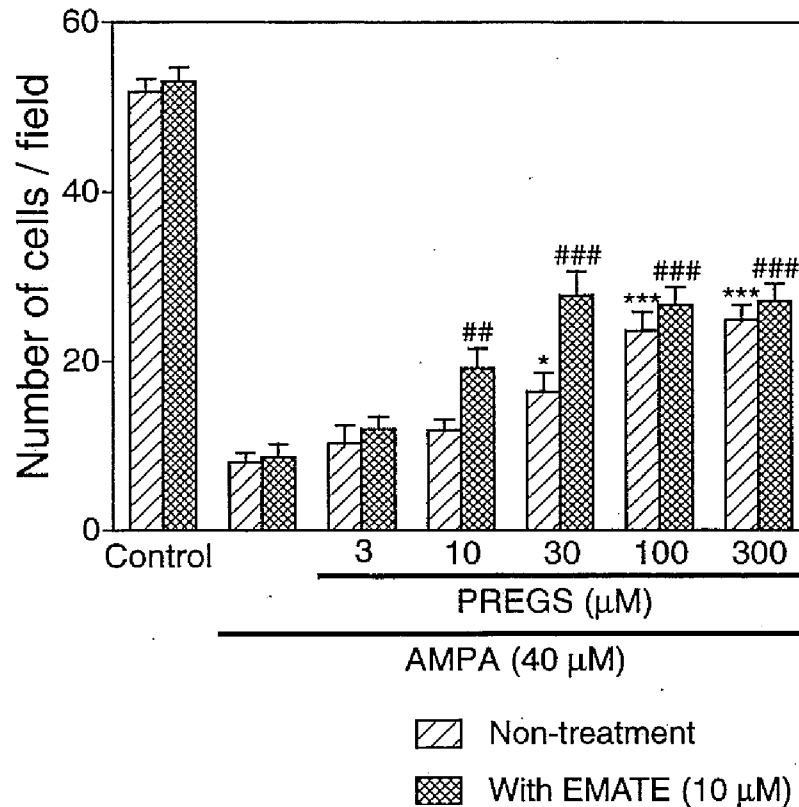


図 2-16 PREGSのAMPA神経毒性保護作用におけるステロイドサルファターゼ阻害薬の作用
PREGSおよびステロイドサルファターゼの不可逆的阻害薬であるEMATEはAMPAと同時に24時間投与した。切片はAMPA処置後に固定してからNissl染色を施した。n = 11-12. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs AMPA alone, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs AMPA with EMATE.

PREGSによるAMPA神経毒性保護作用機序の検討

ステロイドホルモンと同様に、ニューロアクティブステロイドもまた、その活性発現を古典的な核内受容体を介する経路に依存することが知られている[47,66,67]。そこでPREGSと同時に核内progesterone受容体遮断薬であるRU-486 (10 μ M) またはタンパク合成阻害薬であるcycloheximide (0.1 μ g/ml) を投与してAMPA誘発神経細胞死に対する作用について検討したが、PREGSの保護作用に有意な影響は観察されなかった(図2-17A)。このことからPREGSのAMPA神経毒性に対する保護作用の発現機序に核内受容体を介した経路が関与する可能性は低いことが示唆された。

PREGSはGABA_A受容体機能を顕著に抑制すること[41,59]、およびニューロアクティブステロイドがGABA_A受容体機能を調節することにより細胞死を抑制することが示されている[82]。そこでGABA_A受容体アンタゴニストであるpicrotoxin (100 μM)存在下におけるPREGSの保護作用について検討したが、picrotoxinは有意な影響を与えなかった(図2-17B)。さらにニューロアクティブステロイドは、神経保護活性に関与が示唆されているシグマ受容体に対する調節作用を有することが報告されていることから[8,46,54]、シグマ受容体阻害薬であるrimcazole (10 μM)を投与してPREGSの保護作用について検討したが有意な変化は観察されなかった(図2-17B)。これらの結果より、AMPA誘発神経細胞死に対するPREGSの保護作用において、GABA_A受容体およびシグマ受容体の関与の可能性は排除できることが示唆された。

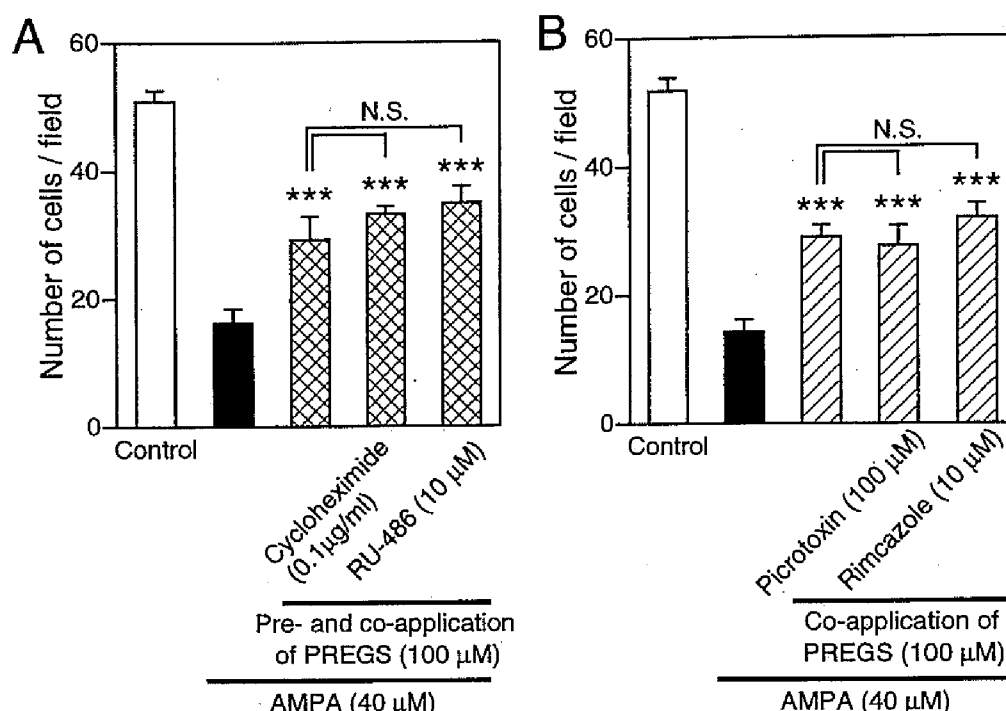


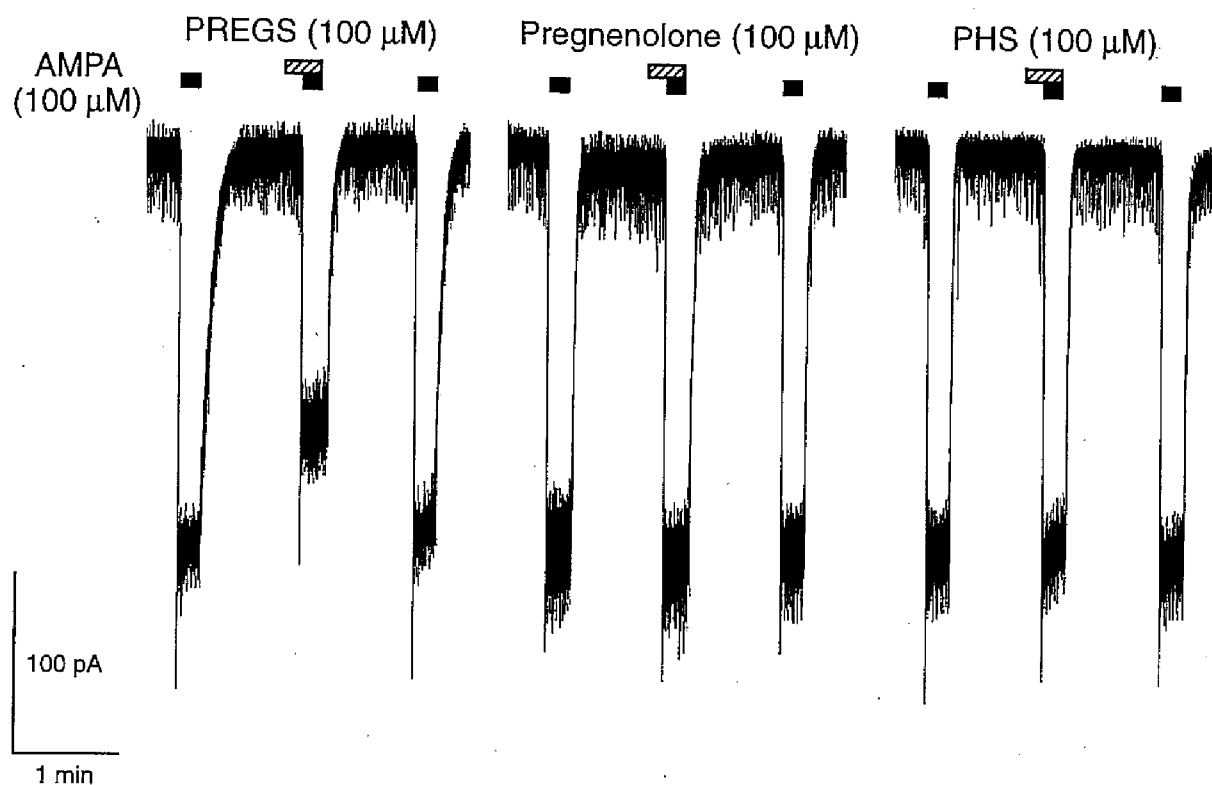
図2-17 PREGSの保護作用における核内ステロイド受容体、GABA_A受容体およびシグマ受容体の関与の検討

(A) CycloheximideおよびRU-486はAMPA処置の24時間前から同時までPREGSと共に投与した (cross-hatched bar)。 (B) PicrotoxinおよびrimcazoleはAMPAおよびPREGSと同時に24時間投与した (hatched bar)。 n = 10-12. *** P < 0.001 vs AMPA alone, N.S.; not significant.

AMPA誘発電流応答に対するPREGSの抑制作用

PREGSのAMPA受容体機能に対する直接的な作用について解析するため、ホールセルパッチクランプ法を用いてAMPA誘発電流応答に対するPREGSおよびその類縁体の作用について検討した。AMPA (100 μM)を1分間隔で連続投与することにより連続的に内向き電流が観察された。AMPA誘発電流はnon-NMDA受容体遮断薬であるNBQX (20 μM)の投与によりほぼ完全に消失した。次にPREGSをAMPA投与の10秒前から投与することで、PREGSのAMPA誘発電流応答に対する作用について検討した。その結果、PREGS (100 μM)はAMPA誘発電流を28%抑制し、この抑制作用はPREGSのwash outにより消失したことから可逆的であることが示された(図2-18A,B)。一方、PREGSのステロイドC3位の置換基だけが異なるpregnenoloneおよびPHSはAMPA誘発電流に対して有意な作用は及ぼさなかった(図2-18A,B)。これらの結果はAMPA誘発神経細胞死におけるPREGSおよびその類似体の作用と一致したことから、PREGSはAMPA受容体機能を抑制することによりAMPA誘発神経細胞死を減弱することが示された。

A



B

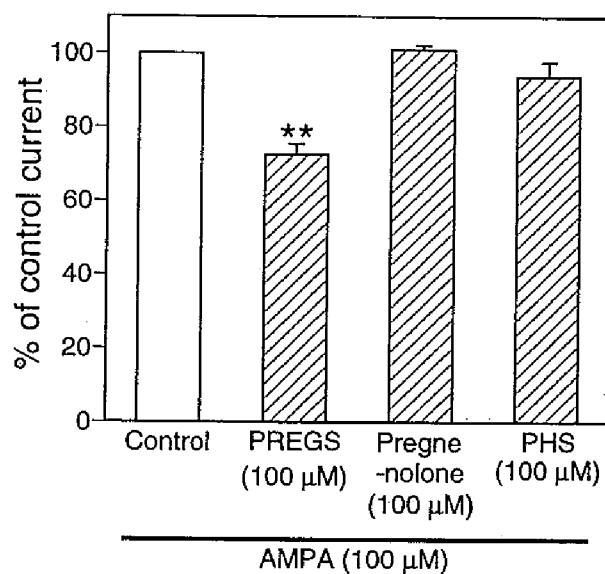


図 2-18 AMPA 誘発電流応答に対する PREGS の特異的な受容体機能抑制作用

PREGS、pregnenolone および PHS による AMPA 誘発電流応答に対する作用の典型例 (A) および PREGS による特異的な受容体機能抑制作用 (B)。各薬物は 10 秒間の前投与を行った後、AMPA と同時に 10 秒間投与した。n = 7. ** $P < 0.01$ vs AMPA alone.

考 察

本研究により、培養大脳皮質神経細胞において脳内に最も豊富に存在するニューロアクティブステロイドの一種であるPREGSが、カイニン酸またはAMPAによるnon-NMDA受容体の過剰な活性化を介して惹起される細胞死に対して顕著かつ特異的な神経保護作用を示すことが明らかとなった。PREGSの作用が特異的であるという点は次の二点により立証される。第一に、PREGSとC3位の置換基だけが異なる類似体であるpregnenoloneおよびPHSはカイニン酸およびAMPA誘発神経細胞死に対して有意な作用は示さないということである。第二の点としては、著者および他の研究者らが報告しているように[73,83]、PREGSは他の神経毒であるNMDAにより惹起される神経細胞死に対しては顕著な増悪作用を示すということである。

PREGSがNMDA受容体およびnon-NMDA受容体を介した神経細胞死に対して反対の作用を示したことから、このニューロアクティブステロイドは興奮毒性に対してどのような作用を及ぼすかという疑問が考えられる。この点に関して、以前我々は初代培養大脳皮質細胞においてPREGSがグルタミン酸神経毒性を増悪することを報告している[73]。この結果は高濃度グルタミン酸の曝露により惹起される急性の*in vitro*神経細胞死において、PREGSのnon-NMDA受容体抑制作用よりもむしろNMDA受容体に対する増強作用のほうが優位であることを示している。しかしながら実際non-NMDA受容体サブタイプは、ある病態条件下において主要な役割を果たしていることが報告されている[88]。例えば、カイニン酸受容体の選択的拮抗薬であるLY377770はラット全脳および局所虚血傷害を顕著に抑制し、その作用はNMDA受容体遮断薬であるMK-801の作用よりも強いことが報告されている[57]。さらにラットの反復虚血モデルにおいて惹起される海馬CA1神経細胞のアポトーシスおよび記憶障害に対してAMPA受容体選択的拮抗薬であるYM90Kが遅延性の投与によっても顕著な減弱作用を示すのに対して、MK-801は抗アポトーシス作用も空間記憶の改善作用も示さないことが報告されている[27]。

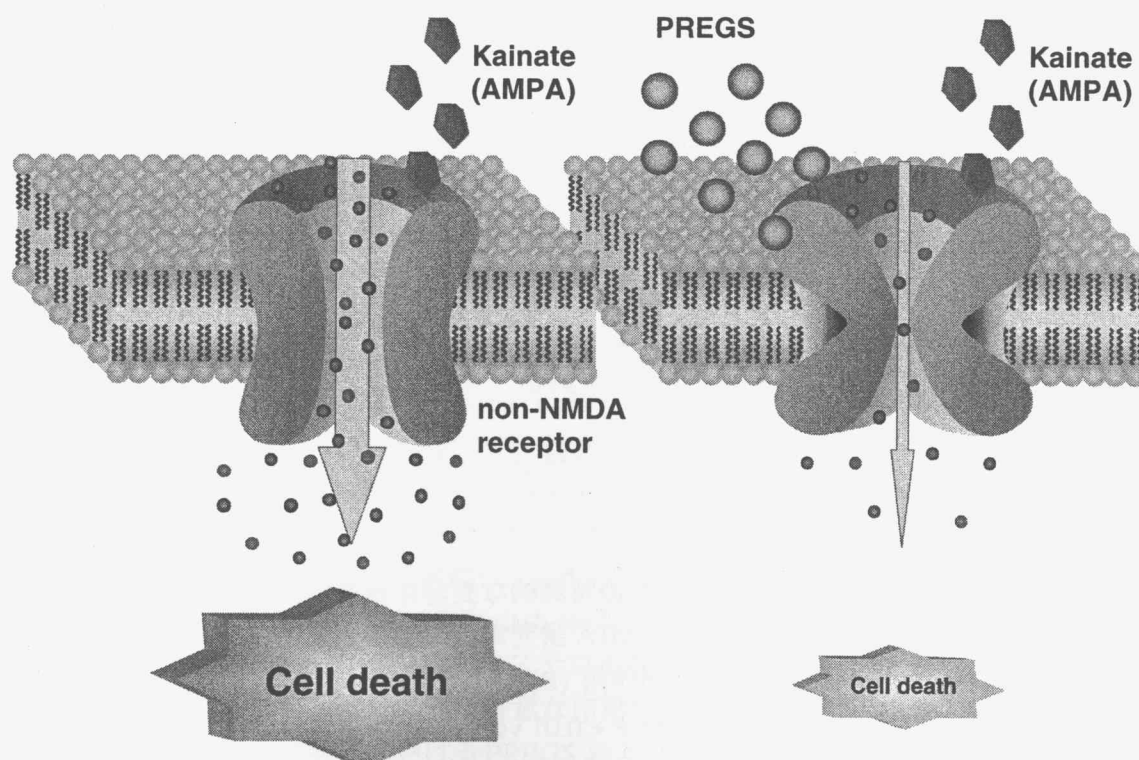


図 2-19 PREGS によるカイニン酸および AMPA 誘発神経細胞死に対する制御

Non-NMDA受容体は筋萎縮性側索硬化症における脊髄神経細胞の変性に関与することが強く示唆されており[80]、この他にもnon-NMDA受容体を介した興奮性神経毒性は低酸素、低グルコース、けいれん、ハンチントン病およびアルツハイマー病などの広範囲な病態に伴う神経障害への関与が示唆されている[88]。以上の知見を踏まえると、これらの疾患においてPREGSが神経保護作用を発揮するか否かについては興味深い課題であると言えよう。

海馬神経細胞においてカイニン酸およびAMPA神経毒性に対する保護作用が報告されているDHEAおよびDHEASは[33]、本研究ではカイニン酸およびAMPA誘発神経細胞死に対して有意な作用を示さなかった。この矛盾については明らかではないが、DHEAおよびDHEASの海馬神経細胞における保護作用はステロイド受容体に関連した作用を介して発現していることが報告されており[34]、この知見を含めて考察すると、我々の用いた培養大脳皮質切片ではこのようなステロイド受容体関連経路の活性が低かったことが本研究における矛盾点の要因となっているのかもしれない。さらに最近 *in vivo* において pregnenolone および DHEA がカイニン酸により惹起される海馬神経細胞死を用量依存的に減弱することが報告された[81]。しかしながらこの報告では、投与した pregnenolone および DHEA が aromatase により estradiol に変換され、その estradiol が保護作用を発揮するという過程が示されている。このようにニューロアクティブステロイドの興奮毒性に対する調節作用は各実験条件下における複雑な基礎環境に基づくと推察できる。

Non-NMDA受容体を介した興奮性神経細胞死に対してPREGSが顕著な保護作用を示したのに対してPREGSの脱硫酸体である pregnenolone が有意な作用を及ぼさなかったことから、ステロイドC3位の硫酸化がこのステロイド化合物の保護作用の発現に必須であることが示された。また脳内ではステロイドサルファターゼの活性が広範囲かつ高レベルに観察され[26,70,77]、そのステロイドサルファターゼの不可逆的阻害薬である EMATE [92] の添加がPREGSの保護作用を増強した。これらの結果よりステロイドサルファターゼおよびスルフォトランスフェラーゼによる pregnenolone と PREGS の変換が、中枢神経系における non-NMDA 受容体を介した興奮性神経細胞死の調節に重要な役割を果たしていることが示唆される。

カイニン酸受容体およびAMPA受容体はサブユニットタンパクのリン酸化により、その受容体機能が調節されることが知られており、PKAにより正の[63]、PKCにより負の[13]制御を受ける。またこれらの protein kinase はニューロアクティブステロイドの生理学的作用に関連することが示唆されている。例えば、海馬神経細胞において報告されている 17β -estradiol によるカイニン酸誘発電流増強作用はPKAの特異的阻害薬により阻害されることが示されている[20]。さらに、視床下部巨大神経細胞において $GABA_A$ 受容体を介した抑制性シナプス伝達が増強することが報告されているが、この調節作用はPKAおよびPKC阻害薬により減弱することが示されている[14]。しかしながら本研究においてcAMPレベルの操作やPKAまたはPKCの活性レベルの調節は、PREGSのカイニン酸受容体に対する抑制作用に対して有意な影響を与えることはなかった。これらの結果はPREGSの保護作用はカイニン酸受容体のリン酸化レベルには影響を受けないことを示唆するものである。

ニューロアクティブステロイドは多様な作用により細胞死を抑制することが知られている。脳虚血傷害時にミトコンドリアに Ca^{2+} が過負荷することにより膜電位の低下が引き起こされアポトーシス性の細胞死が惹起されることが知られているが、DHEAおよびpregnenoloneはこの Ca^{2+} の過負荷を抑制することにより小脳顆粒細胞死を減弱することが報告されている[29]。しかし、DHEAおよびpregnenoloneの硫酸体であるDHEASおよびPREGSはこのようなミトコンドリアに対する作用は有しないと報告されていることから[29]、カイニン酸およびAMPA神経毒性におけるPREGSの保護作用機序にミトコンドリアの機能維持作用が関与する可能性は考えにくい。

さらに Kimonides らは、DHEA および DHEAS が興奮性アミノ酸の投与により惹起される海馬神経細胞死を減弱し、その作用は前処置時に顕著に観察されることから、グルタミン酸受容体機能に対する直接的な抑制作用よりもむしろ遺伝子の転写を介した作用による寄与が大きいことを報告している [33,34]。そこでタンパク合成阻害薬である cycloheximide および核内受容体遮断薬である RU-486 の添加により PREGS のカイニン酸および AMPA 神経毒性における保護作用について検討したが有意な作用は及ばなかった。このことから PREGS の保護作用においてゲノミックな作用が寄与している可能性は低いと考えられる。

PREGSをはじめとするニューロアクティブステロイドは GABA_A 受容体機能を抑制することによりウサギ腎近位尿細管細胞をミトコンドリア障害および低酸素により惹起される細胞死から保護することが報告されている [82]。このことからカイニン酸および AMPA 神経毒性に対する PREGS の保護作用機序に GABA_A 受容体機能抑制が関与している可能性が挙げられた。しかし GABA_A 受容体遮断薬である picrotoxin 存在下においても PREGS の保護作用に有意な影響は観察されなかったことから、GABA_A 受容体の関与の可能性は排除できると考えられる。

最近、DHEAS が培養ラット海馬神経細胞死に対して減弱作用を有することが示された [40]。この DHEAS の保護作用は rimcazole の投与により拮抗されることから、その保護作用機序の少なくとも一部にシグマ受容体の調節を介した作用が関与することが示唆された。PREGS も DHEAS と同様にシグマ受容体に対してアゴニスト活性を有することから [7,46,54]、カイニン酸および AMPA 神経毒性に対する PREGS の保護作用機序にシグマ受容体の活性化を介した作用が関与する可能性が挙げられた。しかし rimcazole を添加した切片においても PREGS は顕著にカイニン酸および AMPA 神経毒性から大脳皮質神経細胞を保護した。このことから、PREGS の神経保護作用におけるシグマ受容体機能調節の関与は小さいと推察される。

代表的な女性ホルモンである 17 β -estradiol は興奮毒性に対して保護作用を示し [75]、その作用は核内受容体を介するノンゲノミックな経路や [23]、ステロイド A 環が主要な役割を果たす抗酸化作用 [44] などにより発揮されることが報告されている。さらに 17 β -estradiol は NMDA 受容体機能に対する直接的な抑制作用を介して NMDA 誘発神経細胞死を減弱することが示されており [85]、また最近 Spivak らは、AMPA 受容体におけるニューロアクティブステロイドの結合部位が細胞外の S1S2 ドメインに存在することを報告していることから [76]、PREGS が non-NMDA 受容体機能に対して直接的に抑制作用を発揮している可能性が推測された。そこでカイニン酸および AMPA により誘発される電流応答に対する PREGS の作用をホールセルパッチクランプ法により検討するとともに、カイニン酸誘発細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇応答に対する作用を細胞内カルシウムイメージング法により検討した。その結果、PREGS はカイニン酸および AMPA 誘発電流応答を部分的ではあるが有意に抑制し、カイニン酸誘発細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇応答も同様に抑制した。これらは PREGS が培養脊髄神経細胞においてカイニン酸誘発電流応答を非競合的に抑制した [90]、およびアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた再構成系においてカイニン酸または AMPA 誘発電流応答を抑制した [93] という以前の報告を支持するものである。一方、PREGS の C3 位の置換基のみが異なる類似体である pregnenolone および PHS はカイニン酸および AMPA 誘発電流応答に対して何ら有意な作用は及ばなかった。以上の結果は、カイニン酸および AMPA 誘発神経細胞死における PREGS およびその類縁体の作用と一致する。これらをまとめると、本研究において観察された PREGS のカイニン酸および AMPA 誘発神経細胞死に対する保護作用は、non-NMDA 受容体機能に対する PREGS の直接的な抑制作用に基づくと推察することができる。

本研究においてカイニン酸および AMPA 誘発神経細胞死を減弱するのに必要な PREGS の濃度 (10-300 μ M) は、ラット脳内 [6,11] や、ヒト脳内 [87] およびヒト血漿中 [61] において報告されている生理的な濃度よりも比較的高いものであった。しかしながらニューロアクティブステ

ロイドの生合成および遊離は、脳虚血、けいれん、うつなどの様々な病態条件下において増強される可能性が挙げられている[21,35,50]。さらにPREGSは負電荷を有することから容易には細胞内へ取り込まれないと想定されることから、脳内の神経細胞やグリアにおいて生合成および遊離されたニューロアクティブステロイドが、神経細胞の周囲の微小空間において局所的に高濃度に達する可能性は十分考えられる。また、筋萎縮性側索硬化症などの慢性的に進行性に経過する神経変性疾患において、神経細胞の生存または変性に至る過程は外因子によるわずかな調節作用に依存していることが報告されている[65]。そのような状況においては、本研究で保護作用が観察された濃度よりもさらに低い濃度のPREGSによっても興奮毒性が減弱される可能性が考えられる。さらにWell-Engererらは、アルツハイマー病患者の剖検脳におけるタウタンパクの異常なリン酸化はPREGSおよびDHEASの脳内レベルの低下と密接に関連していることから、PREGSおよびDHEASがアルツハイマー病において内因性の保護因子として作用する可能性を報告している[87]。

結論として、non-NMDA受容体の刺激により惹起される神経細胞死において、PREGSは急性的にnon-NMDA受容体機能を抑制し、細胞外からのカチオンの流入を抑制することにより、カイニン酸またはAMPA誘発神経細胞死に対して保護作用を示すことが明らかとなった。このことはPREGSが内在性の興奮毒性調節因子として働いていることを示唆するものである。

第三章

興奮毒性および虚血傷害に対する aminoglutethimide の保護作用

中枢神経系は従来末梢器官により生合成および分泌されるステロイドホルモンの標的器官と位置づけられてきたが、近年の研究により脳内においても独自に生合成されるニューロステロイドが様々な生理的作用を担っていることが明らかになりつつある[18,43,49,78]。PREGSはNMDA受容体機能を増強して神経の伝達効率を変化させることにより記憶・学習の増強作用を有することが知られているが[15]、近年海馬切片においてNMDA受容体刺激によりPREGSの産生が惹起されることが報告され[35]、ニューロステロイドによる海馬LTPに対する正のフィードバック機構が存在することが示唆されている。さらにprogesteroneは小脳プルキンエ細胞で生合成され、小脳皮質の新生期においてプルキンエ細胞の樹状突起を伸長させ、棘シナプスの形成を誘導することが報告されている[68]。本論文、第一章および第二章において、標的神経細胞における外因性のニューロアクティブステロイドの興奮毒性調節作用を解明してきたが、このような知見を考慮すると、標的神経細胞において内因性に合成されて存在するニューロアクティブステロイドが興奮毒性に対する神経細胞の脆弱性に影響を与えている可能性が挙げられる。しかしながら、大脳皮質を含めた全脳で神経細胞死に対してニューロステロイド、特に広義のニューロアクティブステロイドがどのように関与しているのかについてはほとんど解明されていない。

Aminoglutethimide (AGT) はcholesterolをpregnenoloneに変換する酵素であるcytochrome p450 side chain cleavage enzyme (P450 scc) およびestrogenの産生を担うaromataseの阻害薬として知られており[16,69]、本邦では未承認であるが米国では前立腺癌や乳癌などのホルモン依存性悪性腫瘍の治療に広く用いられている[3,55]。そこで著者は、AGTを慢性的に投与することにより内在性のステロイド産生を抑制した培養大脳皮質細胞において、興奮毒性および虚血傷害に対する脆弱性の変化について検討した。その結果、AGTを慢性的に投与することにより興奮毒性に対する感受性が顕著に減弱される一方で、虚血傷害に対する抵抗性がAGTの急性的な投与によっても獲得されることを見出した。本章の第一節においてはAGTによる興奮毒性に対する保護作用機序について、第二節においては虚血傷害に対する保護作用機序について解析を行った。

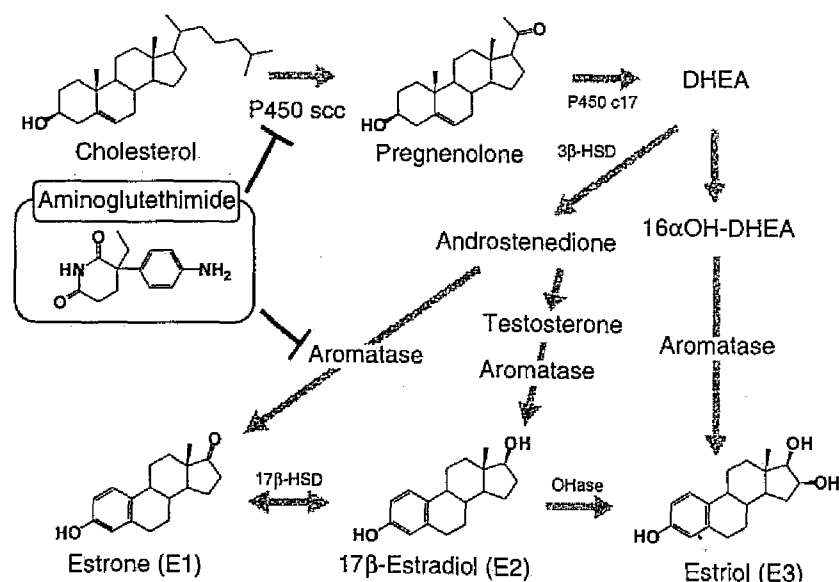


図 3-1 ステロイドホルモン合成酵素阻害薬である aminoglutethimide (AGT) の作用点

実験方法

試薬

本研究にて用いた試薬の購入元は、試薬名の後ろに括弧書きで記した。AGT、estriol、estrone、ionomycin および ketoconazole は Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA) より購入した。LY 294002、PD 98059、SB 203580 および staurosporine は Calbiochem (San Diego, CA, USA) より、KT5720 は和光純薬工業 (大阪) より購入した。2,4-Dichloro-6-nitrophenol (DCNP) は Acros Organics (Morris Plains, NJ, USA) より、trilostane は Steraloids Inc. (Newport, RI, USA) より、exemestane は LKT Laboratories, Inc. (St. Paul, MN, USA) より購入した。第一章にて使用した試薬に関しては省略した。その他の記載のない試薬に関しては、すべてナカライテスク (京都) より購入した。

初代分散培養大脳皮質細胞の調製及び維持

分散培養細胞は、 1.7×10^6 cells/ml の濃度に設定した細胞懸濁液を 0.1% ポリエチレンイミンでコーティングした 48 well plate に 1well あたり 200 μ l ずつ (培養開始密度; 0.45×10^6 cells/cm²) 分注することにより調製した。その他は第一章実験方法に準じて行った。

初代分散培養大脳皮質細胞における薬物処置および神経毒性の評価

グルタミン酸処置は培養11-13日目の成熟した細胞を各薬物を含む10%ウマ血清含有イーグル液中で24時間維持することにより行った。薬物は、特に記述の無い限りは、グルタミン酸処置の24時間前から、グルタミン酸処置と同時まで投与した。AGTおよび各種ステロイド化合物は指示された期間投与した。神経毒性は以下の2通りの方法にて評価した。

LDH release assay

グルタミン酸処置後の培養上清 15 μ l と、基質発色試薬溶液を3倍に希釈して得られた基準溶液 75 μ l を 96 well plate を用いて混合し室温にて1時間反応させた。100 μ l の 1 N 塩酸により反応を停止させた後、マイクロプレートリーダーを用いて 570 nm の吸光度を測定した。グルタミン酸 (10 mM) 24 時間処置群の培養細胞における傷害を standard injury として、各薬物を処置した培養細胞の吸光度を standard injury の吸光度に対する百分率 (% of standard injury (LDH)) で表すことにより神経毒性を評価した。その他は第二章実験方法に準じて行った。

3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

MTT は細胞内のミトコンドリア脱水素酵素の基質として認識され、生存能の高い細胞において還元されることから、その結果生じた暗紫色のホルマゼン量が生存細胞数と相関する。そこで、生存細胞を検出する目的で MTT assay を行った。グルタミン酸処置後の培養細胞を MTT (0.5 mg/ml) 含有イーグル液にて2時間37℃にて維持した。Isopropanol (200 μ l) で可溶化し、マイクロプレートリーダーを用いて 595 nm の吸光度を測定した。グルタミン酸 (10 mM) 24 時間処置群の培養細胞から得られた吸光度を 0%、control 群から得られた吸光度を 100% として、各薬物を処置した培養細胞の吸光度を百分率 (Viability (% of control)) で表すことにより神経毒性を評価した。

細胞内 Ca^{2+} 濃度測定

AGTの処置は培養2日目より、Fura-2の負荷中を除いて、グルタミン酸投与と同時まで継続的に行った。データはグルタミン酸投与直後の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇のピーク値 (Peak amplitude) およびグルタミン酸投与9分後の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇値 (Amplitude at 9 min) を Ca^{2+} 流入量の指標として算出し、グルタミン酸単独群における値を100%として示した。細胞に与える波長340 nmおよび380 nmの励起光は各々3-4秒間隔とし、他の実験方法は第一章実験方法と同様の方法で行った。

培養大脳皮質切片の調製及び維持

第一章実験方法と同様の方法で行った。

化学的虚血負荷

培養10-11日目より無血清培地で24時間維持した切片を、D-glucose (10 mM) を添加したRinger's緩衝液 (124 mM NaCl; 4.9 mM KCl; 2 mM CaCl_2 ; 1.2 mM K_2HPO_4 ; 25.6 mM NaHCO_3 ; 1.3 mM MgSO_4 ; NaOHを用いてpH 7.4に調製後、孔径0.22 μm のフィルターで濾過滅菌したものを用いて1時間のpreincubationを行った。次に切片をD-glucose不含でアジ化ナトリウム (3 mM) および2-deoxy-D-glucose (10 mM) を含むRinger's緩衝液を用いて30-60分間、34°C, 5% CO_2 環境下で維持することにより化学的虚血を負荷した。Control処置群はD-glucose (10 mM) を添加したRinger's緩衝液を用いて維持した。負荷終了後、PI (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む無血清培地で24時間のpostincubationを行った [31]。

培養切片における薬物投与および神経毒性の評価

各細胞毒の処置は無血清培地を用いて24時間維持することにより行った。化学的虚血負荷による神経毒性はPIの取り込みを指標として算出した。その他の細胞毒による細胞死の評価はNissl染色、PIの取り込みおよびLDH release assayを指標として行った。Ionomycin およびstaurosporineを適用した切片では、NMDAなどのグルタミン酸受容体アゴニストを適用した切片に比して標本内において不均一な細胞死が惹起される傾向にあり、かつ切片の剥離が高頻度で発生するためNissl染色による生存細胞の同定を行うことはできなかった。その他は第二章実験方法に準じて同様の方法により評価した。

グルタミン酸遊離量の測定

化学的虚血負荷中のRinger's緩衝液を回収し、グルタミン酸定量キット (Amplex Red Glutamic acid / Glutamate Oxidase Assay Kit; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) を用いて遊離グルタミン酸量を測定した。各6 well plateにおける化学的虚血単独負荷時の遊離グルタミン酸量を100%として各薬物処置群の割合を算出した [17]。

統計

データは全て、平均値±標準誤差で表した。培養大脳皮質切片における細胞毒性を示したデータおよび細胞内 Ca^{2+} 濃度測定のデータにおける統計処理はStudent-Newmann-Keuls' testを用い、初代培養大脳皮質神経細胞のデータにおいてはDunnett' test (両側検定) を用いた。培養切片における化学的虚血負荷時のグルタミン酸遊離量の測定におけるデータはpaired t-testを用いた。全ての実験において危険率5%未満の時に統計学的な有意差があると判定した。

実験結果

第一節 興奮毒性に対する aminoglutethimide の作用

初代分散培養大脳皮質神経細胞におけるグルタミン酸誘発神経毒性の検討

はじめに初代培養大脳皮質細胞を用いてグルタミン酸により惹起される神経細胞死について検討した。培養11-12日目にグルタミン酸 (300 μ M) を24時間投与したところ顕著な神経細胞死が観察され、これはNMDA受容体遮断薬であるMK-801 (10 μ M) の投与によりほぼ完全に抑制され、non-NMDA受容体遮断薬であるNBQX (40 μ M) の投与により有意に拮抗された (図3-2A)。さらにタンパク合成阻害薬であるcycloheximide (1.0 μ g/ml) およびRNA合成阻害薬であるactinomycin D (1.0 μ g/ml) を投与することにより部分的ではあるが有意に神経細胞死が減弱された (図3-2B)。次にグルタミン酸 (300 μ M) の24時間投与により惹起される神経毒性におけるphosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) 経路およびmitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路の関与について検討したところ、PI3K阻害薬であるLY 294002 (10 μ M) はグルタミン酸誘発神経細胞死に対して有意な作用を与えなかったのに対して、MAPK kinase (MAPKK) 阻害薬であるPD 98059 (50 μ M) およびp38 MAPK阻害薬であるSB 203580 (30 μ M) を投与することによりグルタミン酸誘発神経細胞死は有意に減弱された (図3-2B)。これらの結果から、初代培養大脳皮質細胞におけるグルタミン酸 (300 μ M) の24時間投与により誘導される神経毒性は、NMDA受容体およびnon-NMDA受容体を介して惹起され、その毒性発現機序の少なくとも一部にはタンパクの *de novo* 合成を必要とする経路が関与し、さらにp38 MAPK およびMAPKKの活性化を介していることが示された。

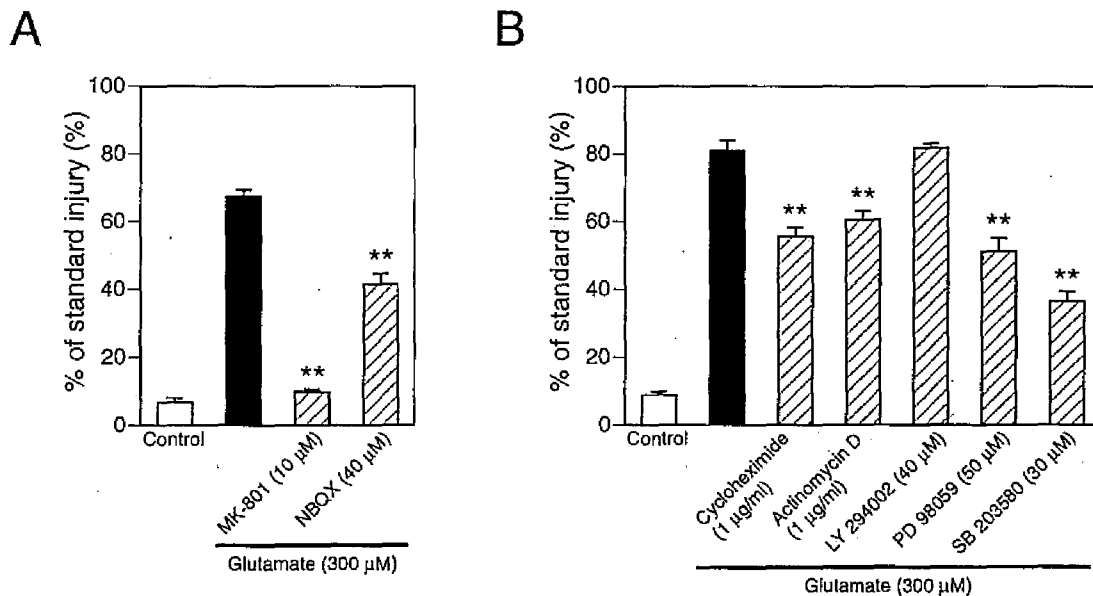


図3-2 グルタミン酸誘発神経細胞死に対する各種阻害薬の作用

グルタミン酸は培養11-12日目に24時間投与し、その後培養上清を用いてLDH release assayを行った。各薬物はグルタミン酸投与の24時間前から同時まで投与した。n = 6. ** $P < 0.01$ vs glutamate alone.

グルタミン酸神経毒性に対する AGT の濃度依存的保護作用

次にステロイドホルモン合成酵素阻害薬である AGT を慢性的に投与した際のグルタミン酸神経毒性に対する大脳皮質神経細胞の感受性について検討した。AGT (3-1000 μM) を培養2日目 (days in vitro 2; DIV 2) から慢性的に投与することにより、グルタミン酸神経毒性に対して 10 μM の濃度から顕著な保護作用が観察され、この保護作用は死細胞の定量方法である LDH release assay (図 3-3A)、および生存細胞の定量方法である MTT assay (図 3-3B) の両方の指標において確認された。さらに AGT をグルタミン酸投与の24時間前から同時まで投与した大脳皮質細胞においても有意な保護作用が観察されたが、その保護作用の程度は培養2日目から AGT を投与した標本のほうが顕著であった (図 3-3C,D)。これらの結果より、AGT は初代分散培養大脳皮質細胞のグルタミン酸神経毒性に対する感受性を減弱し、その作用は慢性投与により増強されることが示された。

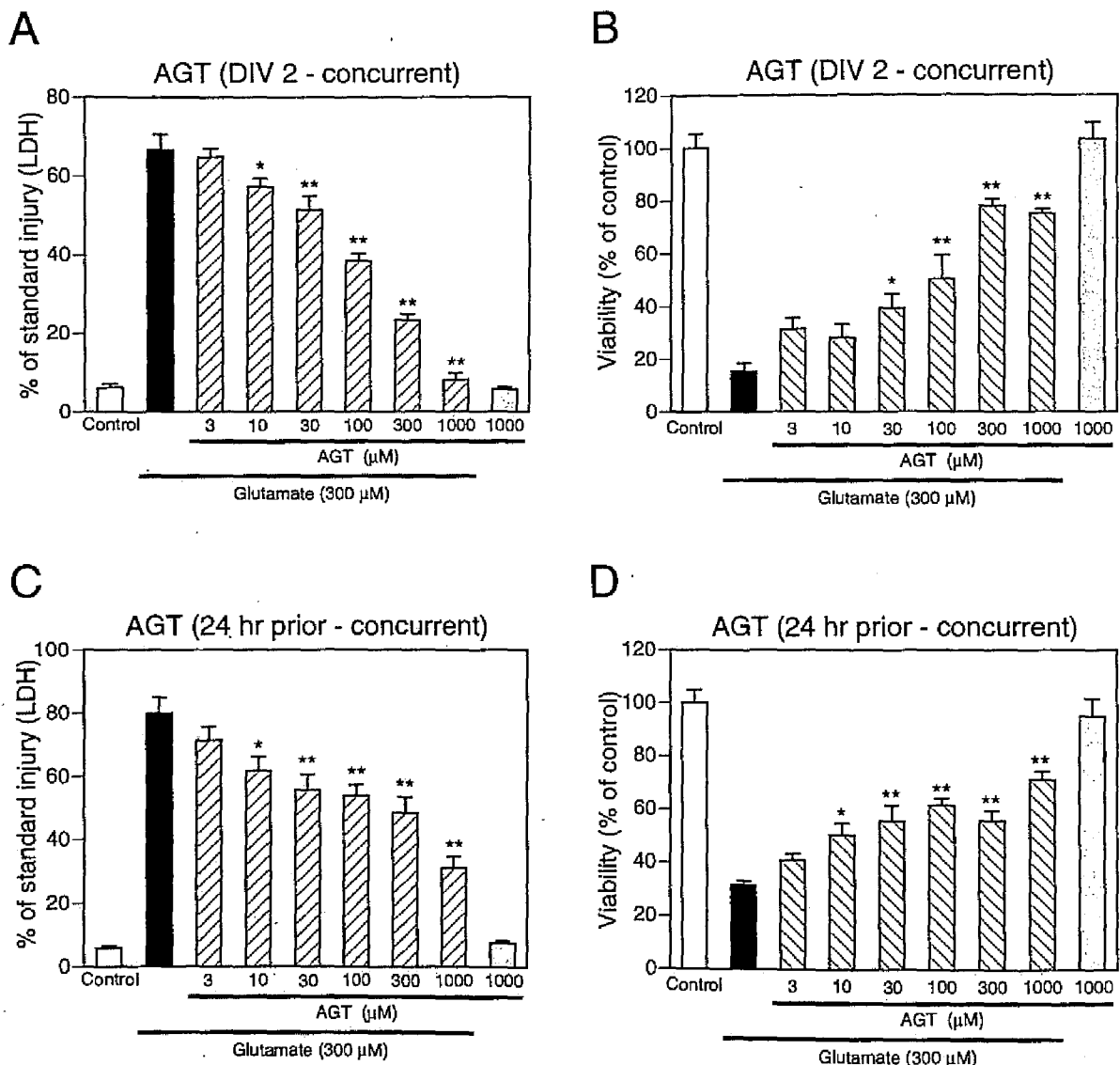


図 3-3 グルタミン酸誘発神経細胞死に対する AGT の濃度依存的保護作用

グルタミン酸は培養11-12日目に24時間投与し、その後培養上清を用いて LDH release assay を、培養組織を用いて MTT assay を行った。AGT は培養2日目より慢性的に (A,B)、またはグルタミン酸投与の24時間前から投与し (C,D)、グルタミン酸投与時も添加した。(A,C) LDH release assay による評価、(B,D) MTT assay による評価。n = 6. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs glutamate alone.

グルタミン酸神経毒性に対する AGT の保護作用における pregnenolone 添加の影響

ステロイドホルモン合成酵素阻害薬である AGT が顕著な保護作用を示すこと、およびその保護作用は濃度依存的かつ投与期間依存的であることから、AGT の保護作用は標本内のステロイドホルモン量の減少に起因することが想定された。そこで AGT が阻害活性を示すことが知られている P450_{scc} の代謝産物であり、全てのステロイドホルモンの前駆体である pregnenolone を AGT と同時に培養 2 日目より投与してその作用について検討したが、AGT の保護作用に有意な影響は観察されなかった (図 3-4A)。さらに AGT を培養 6 日目より投与した初代分散培養細胞においてもグルタミン酸神経毒性に対する顕著な保護作用は観察されたが、pregnenolone の添加は有意な作用は及ぼさなかった (図 3-4B)。これらの結果より、AGT の保護作用はステロイドホルモン前駆体の補充には影響されない経路を介して誘導されていることが示唆された。

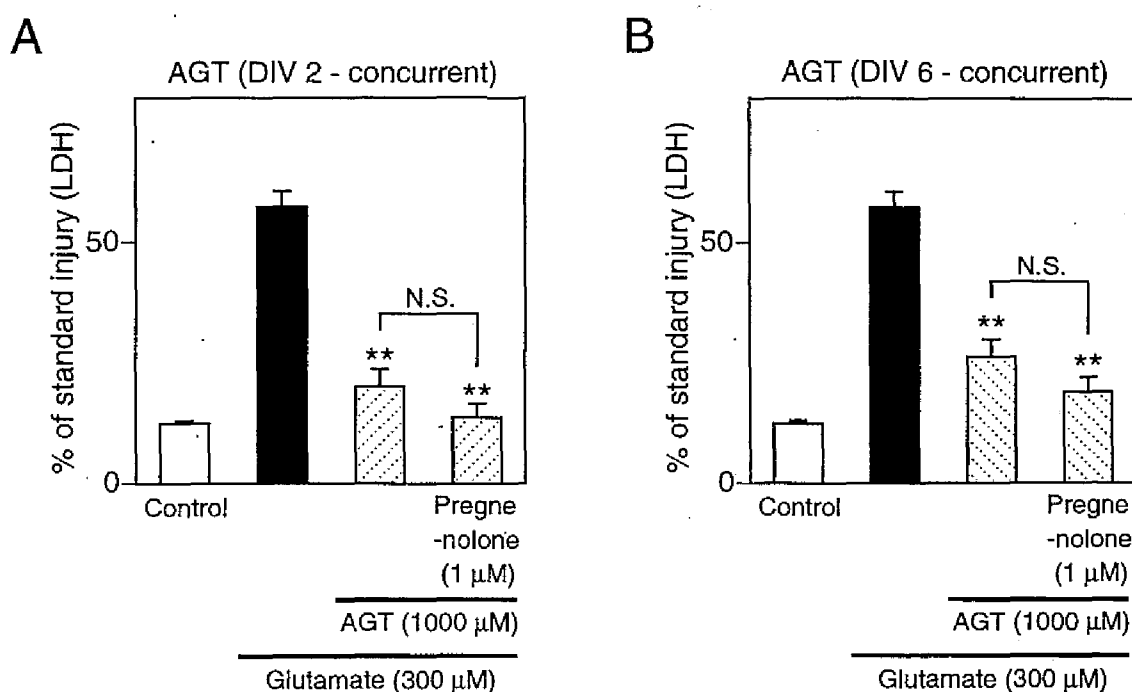


図 3-4 グルタミン酸神経毒性に対する AGT の保護作用における pregnenolone 添加の影響
グルタミン酸は培養 11-12 日目に 24 時間投与し、その後培養上清を用いて LDH release assay を行った。AGT および pregnenolone は培養 2 日目 (A) より、または培養 6 日目 (B) より添加し、グルタミン酸投与時も添加した。n = 6. ** $P < 0.01$ vs glutamate alone, N.S.; not significant.

培養大脳皮質切片における興奮毒性に対する AGT の保護作用

著者が調製した初代分散培養大脳皮質細胞は、以前の報告において 90% 以上が神経細胞であることが示されている[39]。一方脳組織内においてニューロアクティブステロイドを含むステロイドホルモンは、神経細胞のみならず脳内に豊富に存在するグリア細胞においても産生されることが知られている[11,96]。そこで、初代分散培養大脳皮質細胞よりも細胞構築が *in vivo* に近い状態で保持されている培養大脳皮質切片を用いて興奮毒性に対する AGT の作用について更なる検討を行った。

培養大脳皮質切片において NMDA (20 μ M) の 24 時間投与により惹起される神経細胞死に対して、AGT (100-1000 μ M) を培養初日 (DIV 1) から慢性的に投与することにより、濃度依存的な神経細胞死減弱作用が観察された (図 3-5)。この神経保護作用は Nissl 染色による生存細胞数の計数 (図 3-5A)、PI の取り込み量の測定による死亡細胞の定量 (図 3-5B)、および死亡細胞から漏出する LDH の遊離量による定量 (図 3-5C) のいずれの指標においても確認された。

グルタミン酸神経毒性には non-NMDA 受容体の活性化を介した経路も関与することから、non-NMDA 受容体のアゴニストであるカイニン酸または AMPA により惹起される興奮毒性に対する AGT の作用について検討した。AGT (100-1000 μ M) を培養初日から慢性的に投与することにより、カイニン酸 (40 μ M) または AMPA (40 μ M) 誘発神経細胞死が濃度依存的に減弱され (図 3-6,7)、この AGT の保護作用は Nissl 染色 (図 3-6A,7A)、PI 取り込み (図 3-6B,7B)、および LDH release assay (図 3-6C,7C) のいずれの指標においても観察された。しかしながら、Ca²⁺ ionophore である ionomycin (6 μ M) または各種 protein kinase の強力な阻害薬である staurosporine (6 μ M) の 24 時間の処置により惹起される細胞死に対しては有意な作用は及ばなかった (図 3-8A,B)。以上より、大脳皮質神経細胞においてイオンチャネル型グルタミン酸受容体の過剰な活性化を介した興奮毒性に対して慢性投与した AGT が保護作用を示すことが明らかとなった。

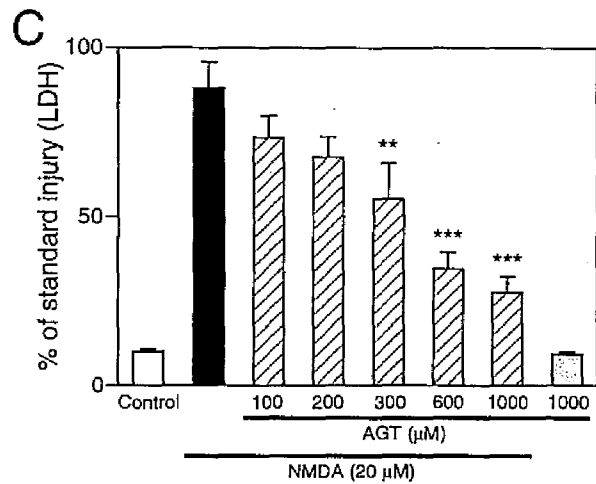
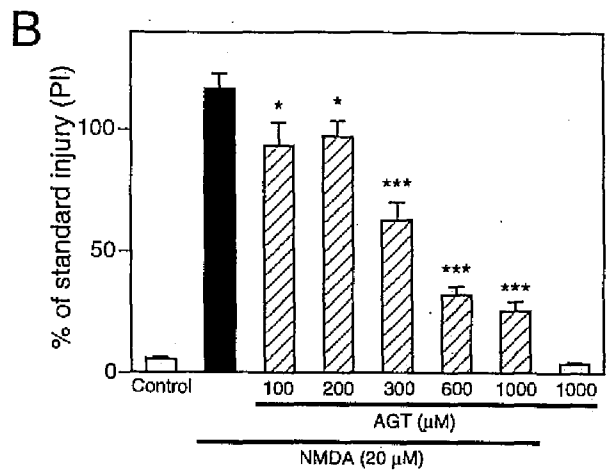
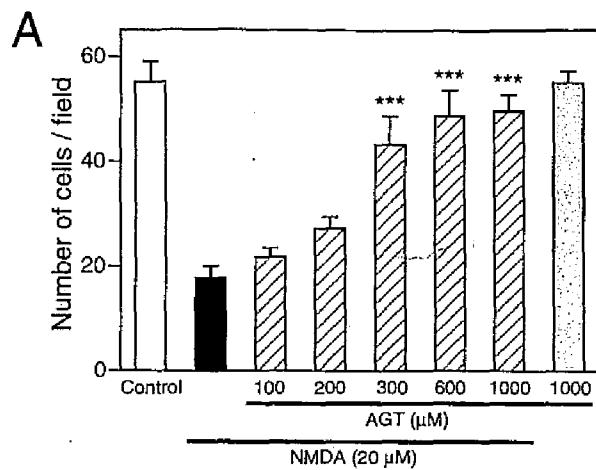


図3-5 NMDA 誘発神経細胞死に対する AGT の濃度依存的保護作用

AGTは培養初日より添加し、NMDA投与時も添加した。切片はNMDA処置後にPI観察を行ってからNissl染色を施した。LDH release assayはNMDA処置後の培養上清を用いて行った。(A) Nissl染色による評価、 $n = 6-7$, (B) PI観察による評価、 $n = 5-7$, (C) LDH release assayによる評価、 $n = 4$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs NMDA alone.

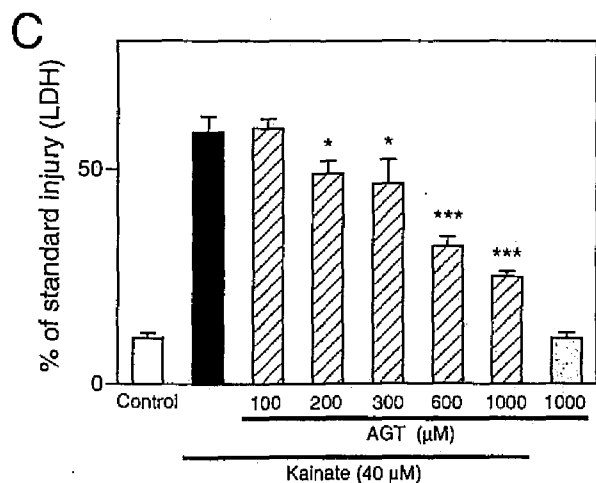
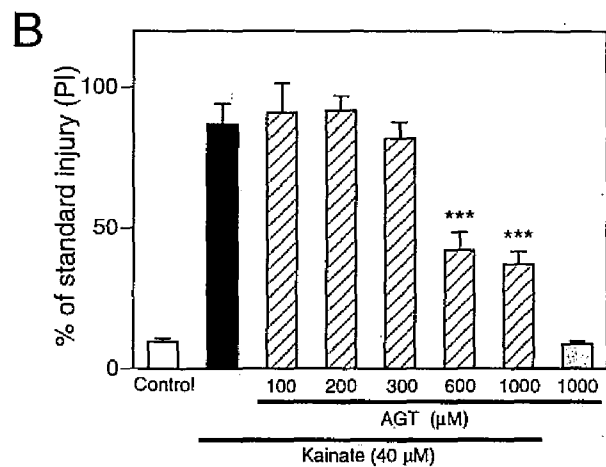
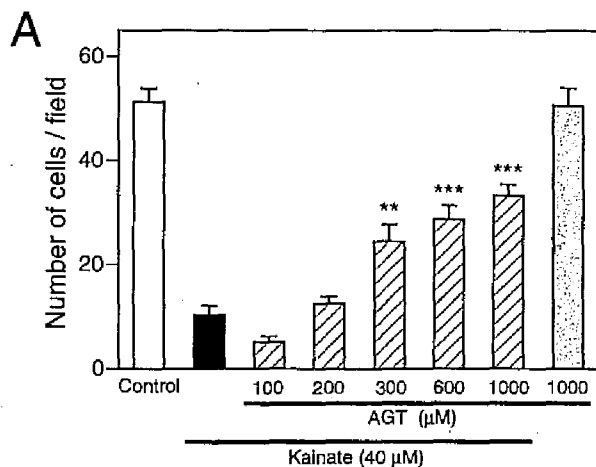


図3-6 カイニン酸誘発神経細胞死に対する AGT の濃度依存的保護作用

AGTは培養初日より添加し、カイニン酸投与時も添加した。切片はカイニン酸処置後にPI観察を行ってからNissl染色を施した。LDH release assayはカイニン酸処置後の培養上清を用いて行った。(A) Nissl染色による評価、 $n = 4-6$, (B) PI観察による評価、 $n = 4-6$, (C) LDH release assayによる評価、 $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs kainate alone.

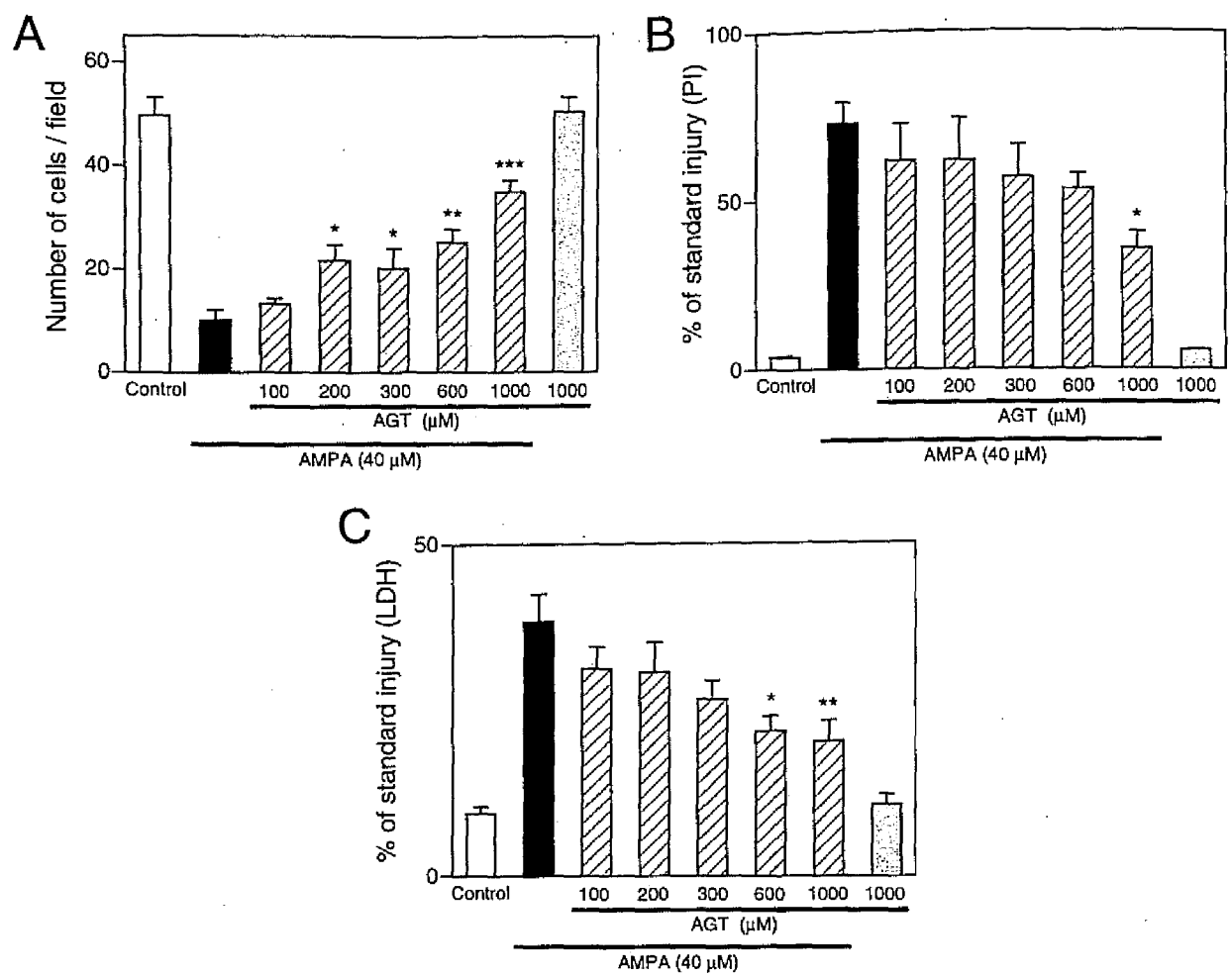


図3-7 AMPA 誘発神経細胞死に対する AGT の濃度依存的保護作用

AGT は培養初日より添加し、AMPA 投与時にも添加した。切片は AMPA 処置後に PI 観察を行ってから Nissl 染色を施した。LDH release assay は AMPA 処置後の培養上清を用いて行った。(A) Nissl 染色による評価、 $n = 6$, (B) PI 観察による評価、 $n = 4-6$, (C) LDH release assay による評価、 $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs AMPA alone.

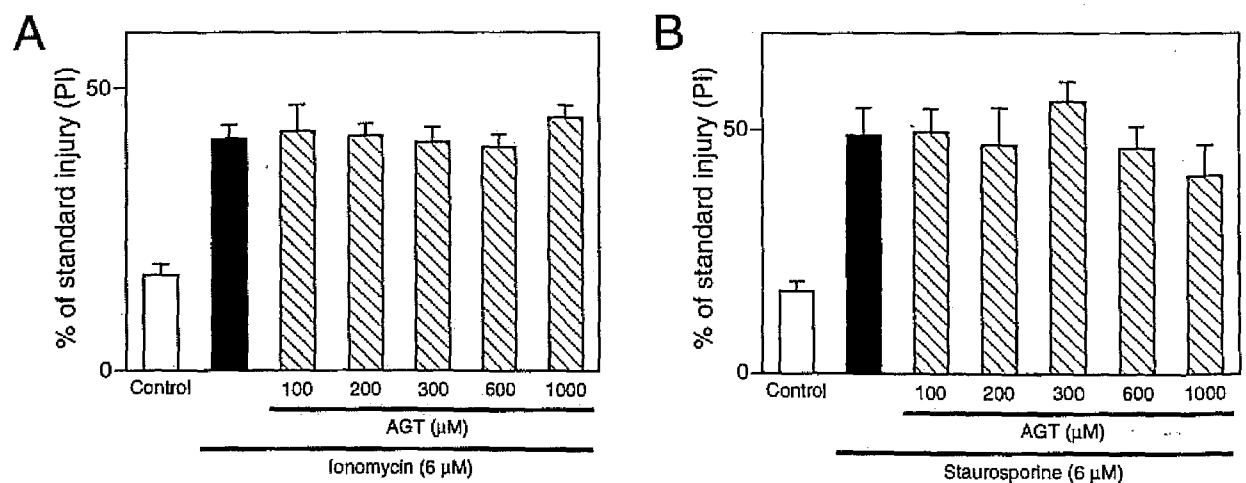


図3-8 Ionomycin および staurosporine 誘発細胞死に対する AGT の作用

AGT は培養初日より添加し、各細胞毒処置時においても同時に投与した。切片は各細胞毒処置後に PI 観察を行った。AGT は ionomycin 誘発細胞死 (A)、および staurosporine 誘発細胞死 (B) に対しては有意な作用を示さなかった。 $n = 5-6$.

AGTによる興奮毒性減弱作用の投与期間依存性

AGTの保護作用における投与期間の影響について検討を行った。培養初日よりAGTを慢性的に投与した切片では顕著な保護作用が観察されるのに対して、NMDAと同時にもしくはNMDA処置の24時間前から同時までAGTの投与を行った切片においては有意な保護作用は観察されなかった。一方、NMDA処置の5日前からAGTを投与した切片では、培養初日から投与した切片と同様に保護作用が観察されたのに対して、培養初日から5日間AGTを投与した後に5日間投与を中止した切片においては、有意な保護作用は観察されなかった(図3-9)。以上の結果より、NMDA処置の数日間前から投与することが、AGTの保護作用の発現に必要であることが明らかとなった。

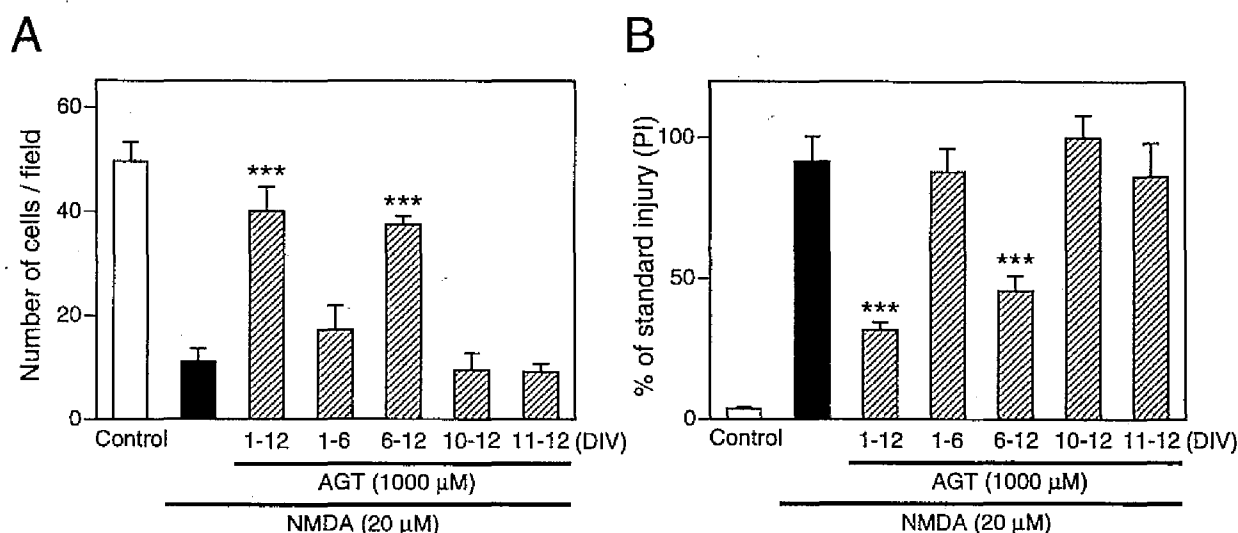


図3-9 NMDA神経毒性に対するAGTによる保護作用の投与期間依存性

培養切片はNMDA処置後にPI観察を行ってからNissl染色を施した。AGTは指示された培養期間に投与した。DIV 1-12; 培養初日よりNMDAとの同時投与まで、DIV 1-6; 培養初日より培養6日目まで、DIV 6-12; 培養6日目よりNMDAとの同時投与まで、DIV 10-12; NMDA処置の24時間前から同時投与まで、DIV 11-12; NMDAとの同時投与のみ。(A) Nissl染色による評価、(B) PI観察による評価。n = 4-6. *** $P < 0.001$ vs NMDA alone.

各種ステロイドホルモン合成酵素阻害薬の慢性投与によるNMDA神経毒性に対する影響

次にAGT以外のステロイドホルモン合成酵素阻害薬を切片に慢性投与した際の興奮毒性に対する脆弱性の変化について検討した。SulfotransferaseはpregnenoloneからPREGSを、DHEAからDHEASを合成する酵素であり[62]、 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD)はpregnenoloneをprogesteroneへ、DHEAをandrostenedioneへと変換する酵素である[70]。またaromataseはAGTが強い阻害活性を示すことで知られており、estrone、estradiolおよびestriolといったエストロゲンの生合成において最終段階の反応を担う酵素である。そこでsulfotransferaseの阻害薬であるDCNP (1-10 μ M)、 3β -HSDの阻害薬であるtrilostane (3-30 μ M) およびaromataseの選択的阻害薬であるexemestane (1-10 μ M) を培養初日からNMDAとの同時投与まで、それぞれ慢性的に投与することにより下流のステロイドホルモンの生合成を阻害した際のNMDA神経毒性に対する影響について検討したが、有意な変化は観察されなかった(図3-10)。

抗真菌薬である ketoconazole は、DHEA 等の生合成を担う 17α -hydroxylase/ $17,20$ lyase (P450 c17) を強く阻害することが知られているが、P450 scc を含む他の P450 酵素群に対しても阻害活性を示すことが報告されている [30]。そこで、AGT 以外の薬物により P450 scc を薬理的に阻害した際の影響を検討するため ketoconazole (10 - $30\ \mu\text{M}$) を培養初日より慢性的に投与して NMDA 神経毒性に対する作用について検討したが有意な影響は観察されなかった。なお、 $50\ \mu\text{M}$ 以上の濃度の ketoconazole は培養切片において単独毒性を示したためその作用を検討することはできなかった。

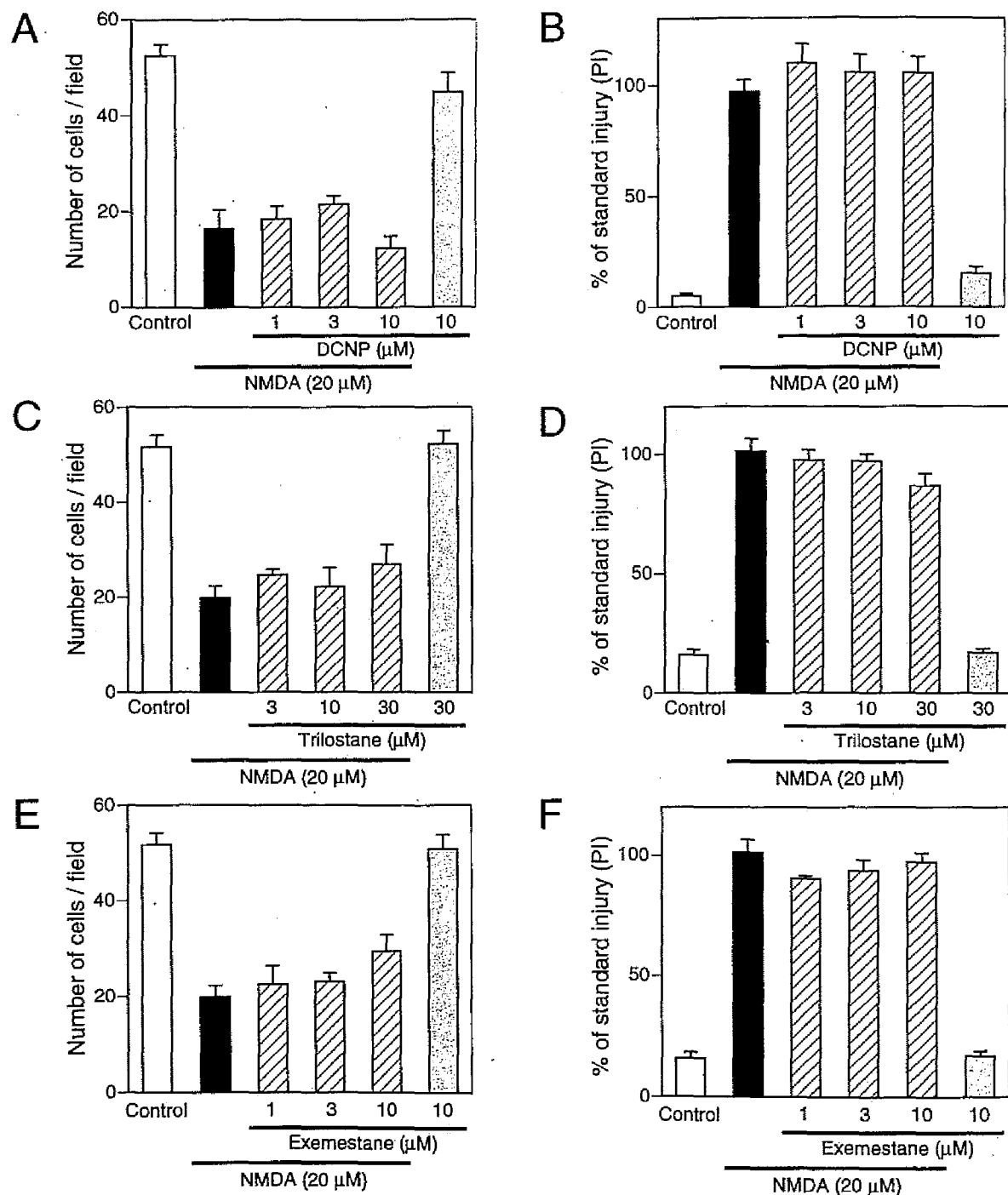


図 3-10 各種ステロイドホルモン合成酵素阻害薬の慢性投与の NMDA 神経毒性に対する作用
Sulfotransferase の阻害薬である DCNP (A,B)、 3β -HSD 阻害薬である trilostane (C,D) および aromatase 阻害薬である exemestane (E,F) は培養初日より NMDA との同時投与まで添加した。切片は NMDA 処置後に PI 観察を行ってから Nissl 染色を施した。(A,C,E) Nissl 染色による評価、 $n = 5$ - 6 , (B,D,F) PI 観察による評価、 $n = 4$ - 6 。

Bastidaらは、副腎皮質刺激ホルモンまたはヒト絨毛性ゴナドトロピンの投与によりステロイド産生組織において誘導される ornithine decarboxylase が AGT により抑制されること、その作用は既知の P450 scc または aromatase に対する阻害作用ではなく、PKA に対する阻害作用に依存することを明らかにした [5]。そこで PKA 選択的阻害薬である KT5720 (0.1-1 μ M) を培養初日から投与することにより切片内の PKA を慢性的に抑制した際の神経細胞の生存率および興奮毒性に対する感受性の両方について検討したが、有意な影響は観察されなかった。

本実験系で通常用いている培地中に 25% 存在するウマ血清には、cholesterolをはじめ estradiol、progesterone および testosterone といったステロイドホルモンが含まれており、これらのステロイド化合物が AGT の興奮毒性減弱作用に影響を及ぼしている可能性は否定できない。そこで、外来性のステロイドホルモンの影響を無視できるよう、無血清培地において AGT の NMDA 誘発神経細胞死に対する作用を評価した。培養大脳皮質切片を培養 6 日目より無血清培地を用いて培養を行ったが、神経細胞の生存率に有意な影響は観察されなかった (図 3-11)。そこで培養 6 日目より AGT を添加してその作用について検討したところ、NMDA の過剰曝露により惹起される神経細胞死に対して顕著な減弱作用を発揮し、この作用は血清含有通常培地および無血清培地のどちらを用いても同程度に認められた (図 3-11)。

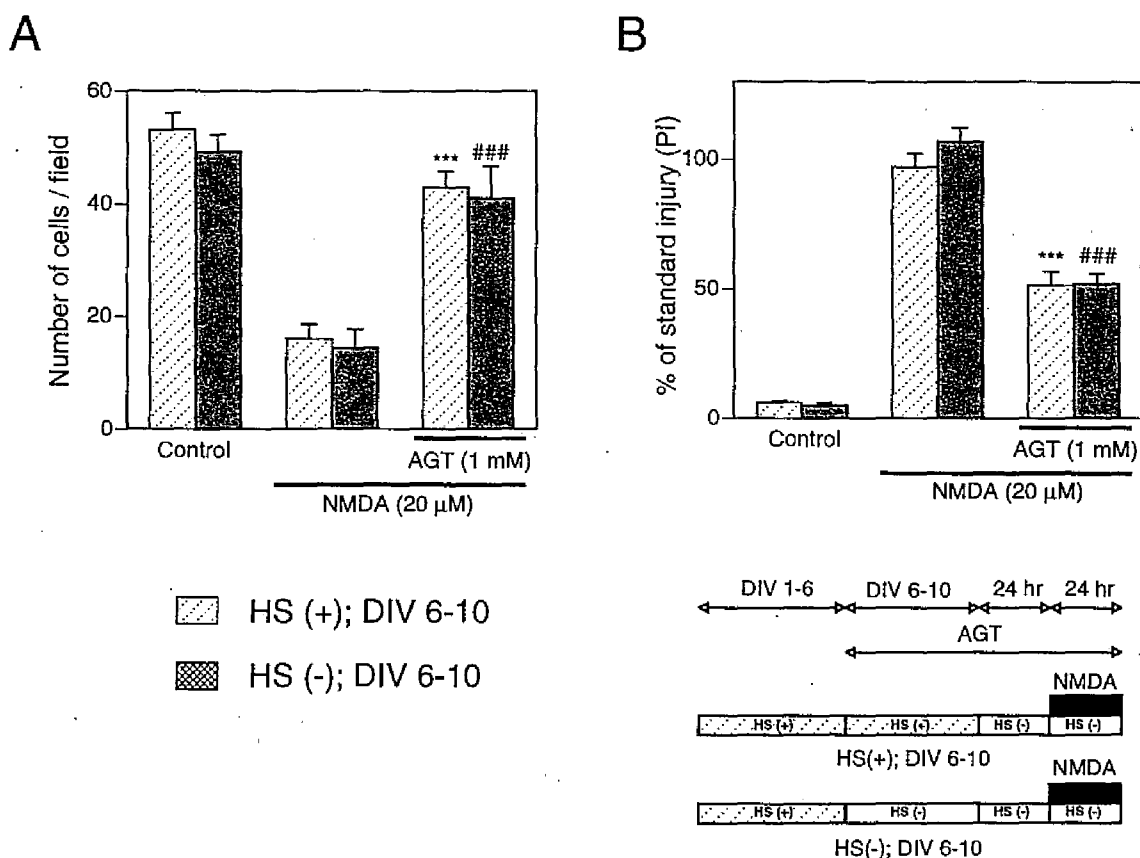


図 3-11 血清含有通常培地または無血清培地の慢性使用時における AGT の保護作用

切片は培養 6 日目までは 25% ウマ血清 (HS) 含有培地を用いて維持し、培養 6 日目より血清含有または不含培地を用いて維持した。培養 10 日目からは両群ともに無血清培地で維持した。AGT は培養 6 日目より NMDA との同時投与まで添加した。切片は NMDA 処置後に PI 観察を行ってから Nissl 染色を施した。(A) Nissl 染色による評価、(B) PI 観察による評価。n = 6. *** $P < 0.001$, ### $P < 0.001$ vs NMDA alone, respectively.

AGT の保護作用における各種ステロイドホルモン添加の影響

AGT の慢性投与により観察される保護作用は切片内のステロイドホルモン含有量の減少に起因することが想定された。そこで AGT が阻害活性を示す酵素である aromatase および P450 scc の代謝産物である estrone (10 μ M)、17 β -estradiol (10 μ M)、estriol (10 μ M) および pregnenolone (1-10 μ M) を無血清培地条件下で AGT と同時に慢性的に添加した際の NMDA 神経毒性に対する脆弱性の変化について検討した。さらに NMDA 神経毒性に影響を与えない低濃度 (1-10 μ M) の PREGS を添加した際の影響についても検討したが、いずれのステロイド化合物の添加によっても有意な変化は観察されなかった (図 3-12)。

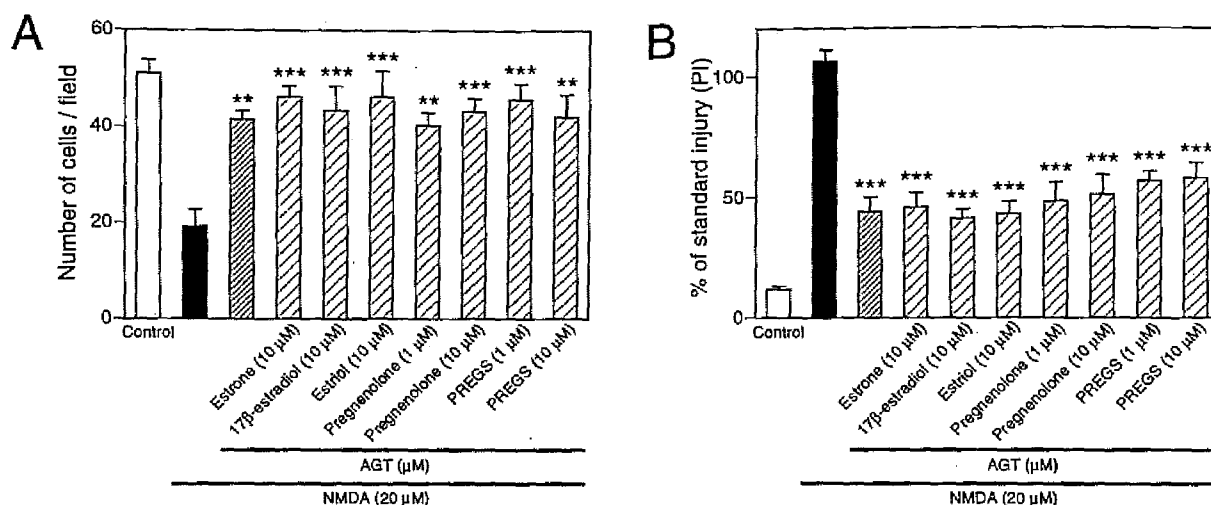


図 3-12 AGT の興奮毒性減弱作用における各種ステロイドホルモン添加の影響

切片は培養6日目までは25%ウマ血清(HS)含有培地を用いて維持し、培養6日目より血清不含培地を用いて維持した。AGTおよび各種ステロイドホルモンは培養6日目よりNMDAとの同時投与まで添加した。切片はNMDA処置後にPI観察を行ってからNissl染色を施した。(A) Nissl染色による評価、(B) PI観察による評価。n=5-6. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs NMDA alone.

AGT 慢性投与のグルタミン酸誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度増大応答に対する影響

AGT 慢性投与による保護作用は、細胞膜に存在する NMDA 受容体の過剰な活性化を介して惹起される興奮毒性に対しては保護作用を示したのに対して、細胞膜上の受容体を介さずに毒性を発現する ionomycin および staurosporine により誘発される細胞死に対しては発揮されなかった。このことから、AGT の慢性投与により細胞膜の流動性等が変化した結果、受容体応答が変化している可能性が挙げられた。そこで、AGT の慢性投与を行った初代分散培養大脳皮質細胞において、グルタミン酸により誘発される細胞内 Ca^{2+} 濃度増大応答が変化するか否かについて第一章と同様の方法で検討した。グルタミン酸誘発細胞内 Ca^{2+} 流入量の指標としては、グルタミン酸投与直後の最大ピーク値およびグルタミン酸投与9分後のピーク値の2つを用いた。培養11-12日目に、細胞死の検討に用いた際と同濃度のグルタミン酸 (300 μ M) を投与することにより誘発される細胞内 Ca^{2+} 濃度増大応答は (図3-13A)、培養2日目より AGT (10-1000 μ M) を慢性的に投与した大脳皮質神経細胞においてもほぼ同様に観察された (図3-13B-D)。このグルタミン酸誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度増大応答はグルタミン酸投与直後の最大ピーク値およびグルタミン酸投与9分後のピーク値の両方の指標においても、グルタミン酸 (300 μ M) 単独投与群と比べて、若干の抑制傾向は認められるものの、有意な変化は観察されなかった (図3-13E,F)。これらの結果より、AGT を慢性的に投与した大脳皮質神経細胞において観察される著明な神経毒性減弱作用は、受容体機能の強い抑制に依存する現象ではないことが示された。

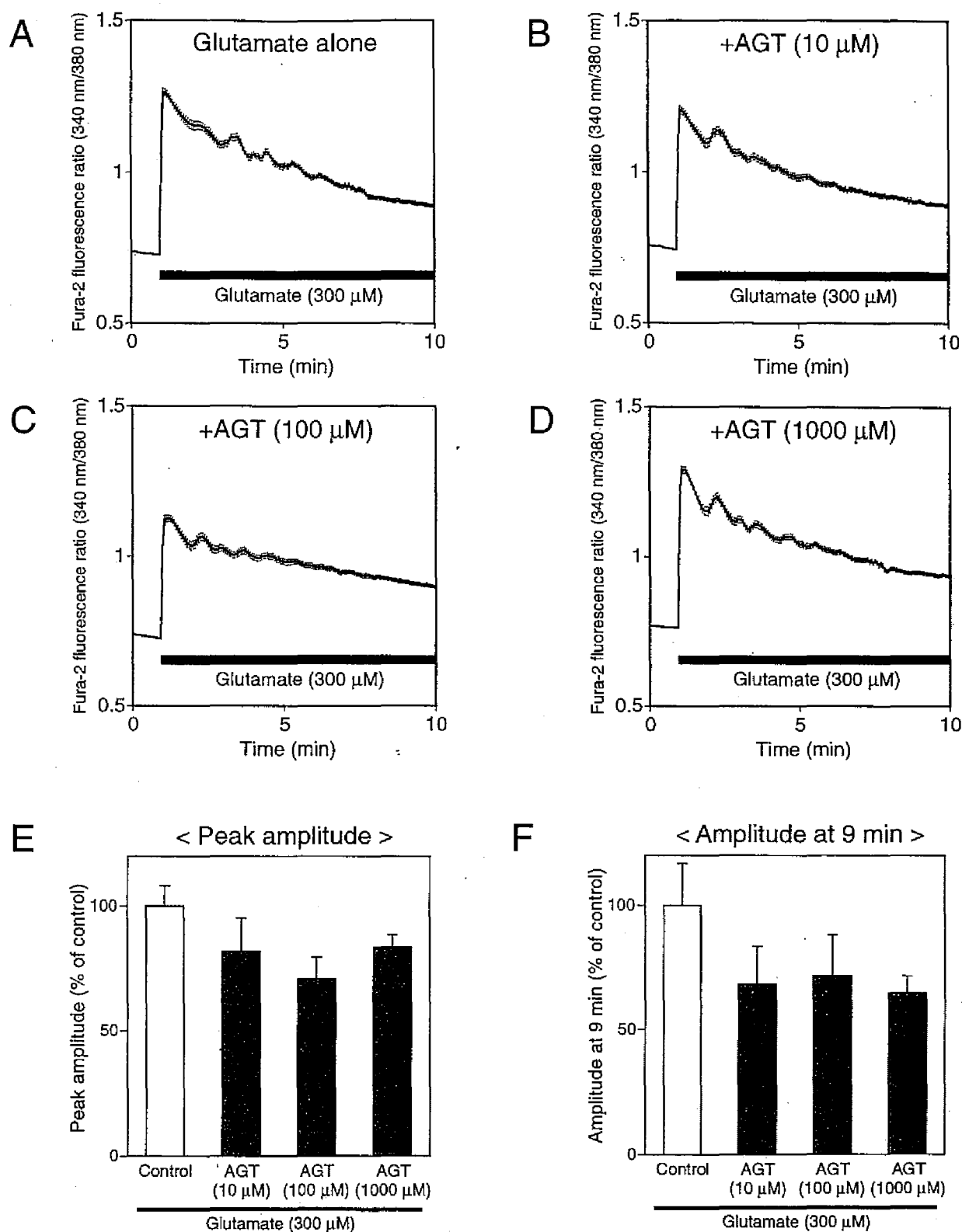


図3-13 グルタミン酸誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇応答へのAGT慢性投与による影響

グルタミン酸は測定開始1分後から投与した (black bar)。AGTは培養2日目より慢性投与し、細胞内 Ca^{2+} 濃度測定中もグルタミン酸と同時に投与した。(A) グルタミン酸 (300 μM) 単独投与群における応答の典型例、(B-D) AGT慢性投与群におけるグルタミン酸応答の典型例。AGT (10-1000 μM) を慢性的に投与してもグルタミン酸応答に有意な変化は観察されなかった。グルタミン酸投与直後のピーク値 (E) およびグルタミン酸投与9分後のピーク値 (F) をグルタミン酸単独投与群を100%として算出し、細胞内への Ca^{2+} 流入量の指標とした。n = 5-9。

第二節 虚血傷害に対する aminoglutethimide の作用

培養大脳皮質切片における化学的虚血誘発細胞障害の検討

臨床における脳血管疾患では、一過性の脳虚血後に再び血流が再開する塞栓性脳虚血の病態が多く、その細胞障害は虚血中に細胞外へ異常に漏出するグルタミン酸により惹起されることが知られている [1,48]。そこで *in vivo* の脳虚血モデルで誘導される低酸素-低血糖およびその後の再灌流状態を *in vitro* 実験系に反映させた系として培養大脳皮質切片における化学的虚血負荷モデルを再現した。虚血負荷には、酸化リン酸化を阻害するアジ化ナトリウム (3 mM) および解糖系の阻害薬である 2-deoxy-D-glucose (10 mM) を含んだ Ringer's 緩衝液を用い、化学的虚血負荷後に 24 時間の postincubation を行うことにより再灌流状態を再現した [31]。培養 10-11 日目の大脳皮質切片を無血清培地で 24 時間維持した後、30-60 分の化学的虚血を負荷すると、虚血負荷直後には観察されなかった細胞障害が 24 時間の postincubation を行うことにより負荷時間依存的に惹起された (図 3-14A)。さらに虚血負荷中の Ringer's 緩衝液に漏出するグルタミン酸の濃度を測定したところ、細胞障害の程度と相関して、負荷時間依存的に遊離量が増大した (図 3-14B)。

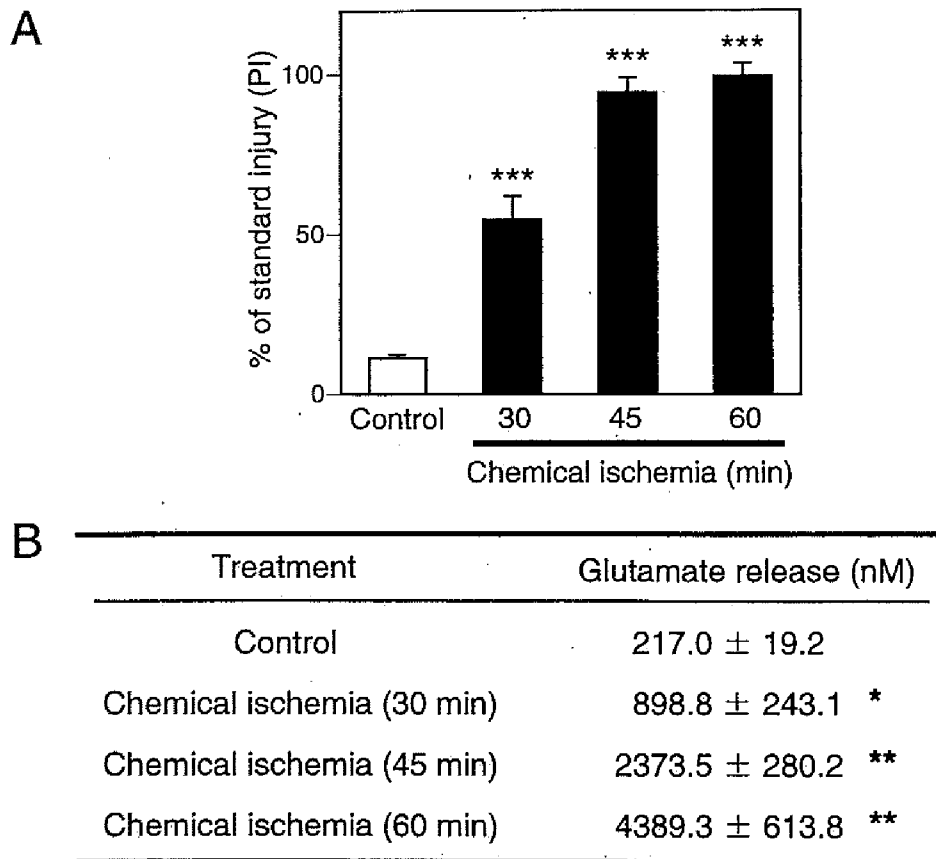


図 3-14 化学的虚血負荷に伴う処置時間依存的な細胞障害およびグルタミン酸漏出
切片は D-glucose (10 mM) を含む Ringer's 緩衝液にて 1 時間維持してから、アジ化ナトリウム (3 mM) および 2-deoxy-D-glucose (10 mM) を含む Ringer's 緩衝液を用いて 30-60 分間インキュベートした。(A) 化学的虚血負荷後、PI (5 μ g/ml) を含む無血清培地を用いて 24 時間の postincubation を行い、PI の蛍光強度を観察することにより神経細胞死を評価した。n = 6. (B) グルタミン酸の遊離量は化学的虚血負荷中の Ringer's 緩衝液を用いて定量 kit により測定した。n = 4. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control.

化学的虚血誘発細胞障害に対する AGT の作用

虚血時において細胞外へ過剰に漏出するグルタミン酸の細胞障害発生への寄与を確認するため、NMDA 受容体遮断薬である MK-801 および non-NMDA 受容体遮断薬である NBQX の作用について検討した。45 分間の化学的虚血負荷により惹起される細胞障害に対して、MK-801 (1 μ M) はほぼ完全に抑制したが、NBQX (20 μ M) は有意な影響を及ぼさなかった。このことから化学的虚血誘発細胞障害において NMDA 受容体の活性化が大きく関与している一方で、non-NMDA 受容体の関与は小さいことが示唆された。

次に AGT を慢性的に投与した切片における虚血傷害の発生について検討した。培養大脳皮質切片に 45 分間の化学的虚血を負荷した際に惹起される細胞障害は、培養初日より AGT (10-1000 μ M) を慢性投与することにより濃度依存的かつ顕著に減弱され、AGT (1000 μ M) 投与群における虚血傷害はほぼ完全に抑制された (図 3-15A)。AGT の投与による虚血傷害減弱作用は培養 6 日目より慢性的に投与した切片においても同様に観察された (図 3-15B)。さらに化学的虚血負荷の 1 時間前より AGT を急性的に投与した切片においても、慢性投与を行った切片と同様に虚血傷害が濃度依存的かつ顕著に減弱された (図 3-15C)。

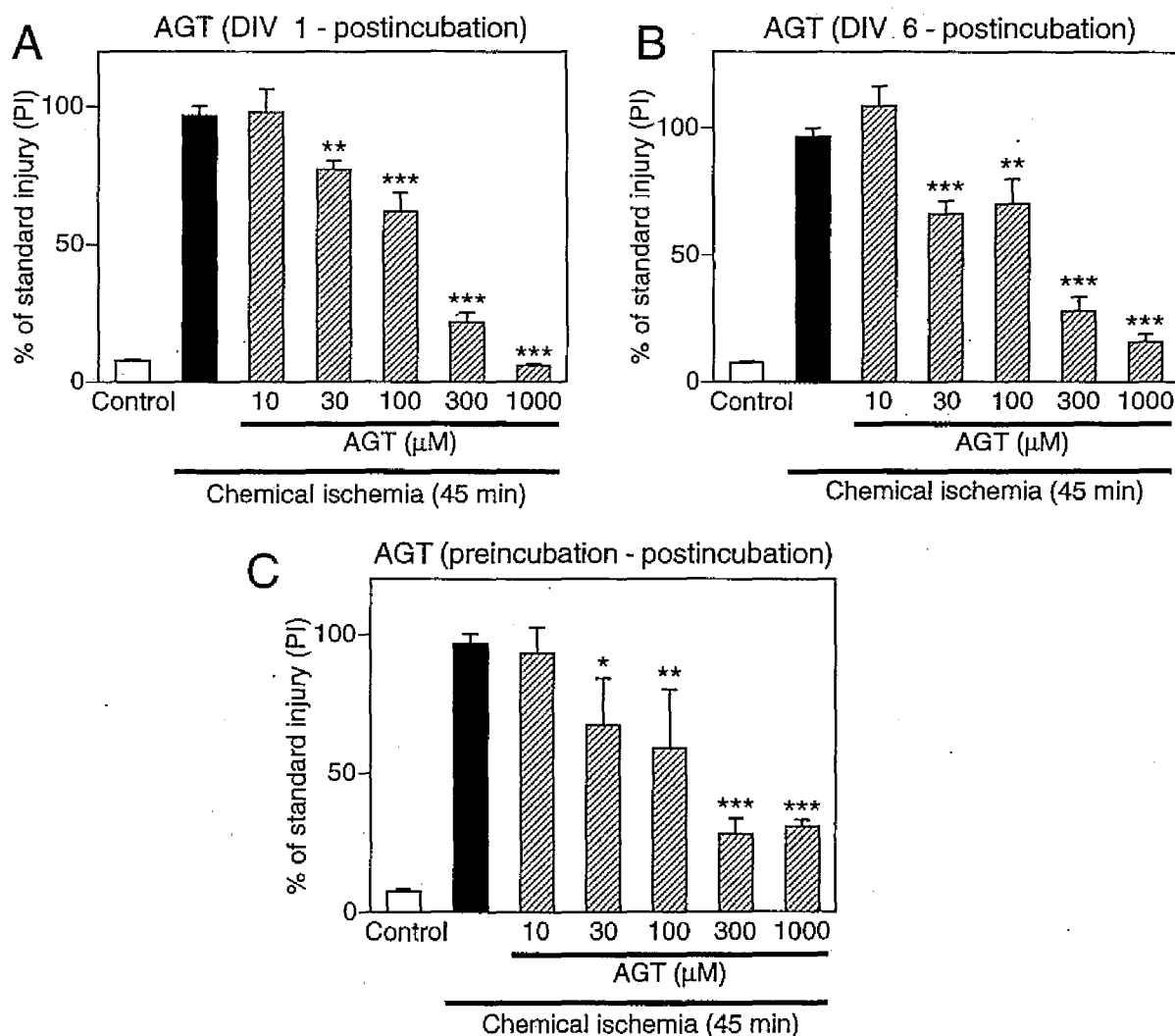


図 3-15 化学的虚血誘発細胞障害に対する AGT の濃度依存的保護作用

AGT は培地あるいは Ringer's 緩衝液に添加して培養初日より (A)、培養 6 日目より (B)、または化学的虚血負荷 1 時間前より (C)、虚血負荷後の 24 時間の postincubation 終了時まで継続的に切片に投与した。虚血負荷後に 24 時間適用した PI の蛍光強度を測定することにより細胞障害を算出した。n = 6-28. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs chemical ischemia alone.

AGT による虚血傷害減弱作用の投与期間依存性

AGT の NMDA 誘発神経細胞死に対する作用が投与期間に依存的事であったことから、NMDA 受容体の関与が大きい虚血傷害に対する AGT の作用についても同様の検討を行った。培養初日より AGT を慢性的に投与した切片ではほぼ完全に虚血傷害が減弱され、さらに虚血負荷 1 時間前より負荷 24 時間後の postincubation 終了時まで AGT の投与を行った切片においても顕著な保護作用が観察された (図 3-16)。一方、虚血負荷の 5 日前から AGT を投与した切片では、培養初日から投与した切片と同様に保護作用が観察されたのに対して、培養初日から 5 日間 AGT を投与した後に 5 日間投与を中止した切片においては、有意ではあるものの部分的な保護作用しか観察されなかった (図 3-16)。以上の結果より、AGT の虚血傷害減弱作用の発現には、慢性的に投与することよりもむしろ虚血負荷時に緩衝液中に存在することのほうが重要であることが明らかとなり、NMDA 誘発神経細胞死に対する保護作用とは異なる機序を介していることが示唆された。

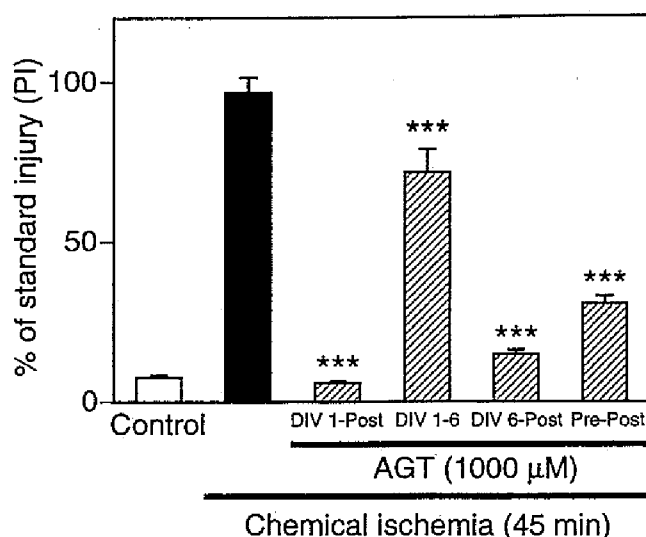


図 3-16 虚血傷害に対する AGT による保護作用の投与期間依存性

AGT は培地あるいは Ringer's 緩衝液に添加して指示された期間に投与した。DIV 1-Post; 培養初日より虚血負荷後の postincubation 終了時まで、DIV 1-6; 培養初日より培養 6 日目まで、DIV 6-Post; 培養 6 日目より虚血負荷後の postincubation 終了時まで、Pre-Post; 虚血負荷 1 時間前より負荷 24 時間後の postincubation 終了時まで。虚血負荷後に 24 時間適用した PI の蛍光強度を測定することにより細胞障害を算出した。n = 6-18. *** $P < 0.001$ vs chemical ischemia alone.

化学的虚血誘発グルタミン酸遊離に対する AGT の作用

虚血時における細胞障害の発生は細胞外へ過剰に遊離するグルタミン酸により惹起されることが広く知られている。そこで化学的虚血負荷時に Ringer's 緩衝液中において顕著に上昇するグルタミン酸濃度に対する AGT の作用について検討した。45 分間の化学的虚血負荷により誘発されるグルタミン酸遊離量の増大に対して、培養初日より AGT (10-1000 μM) を慢性投与すると濃度依存的かつ顕著な減弱作用が観察され、AGT (1000 μM) 投与群ではグルタミン酸遊離量の増大はほぼ完全に抑制された (図 3-17A)。AGT のグルタミン酸遊離抑制作用は、化学的虚血負荷の 1 時間前より AGT を急性的に投与した切片においても、培養初日より慢性投与を行った切片とほぼ同様に濃度依存的かつ顕著に観察された (図 3-17B)。

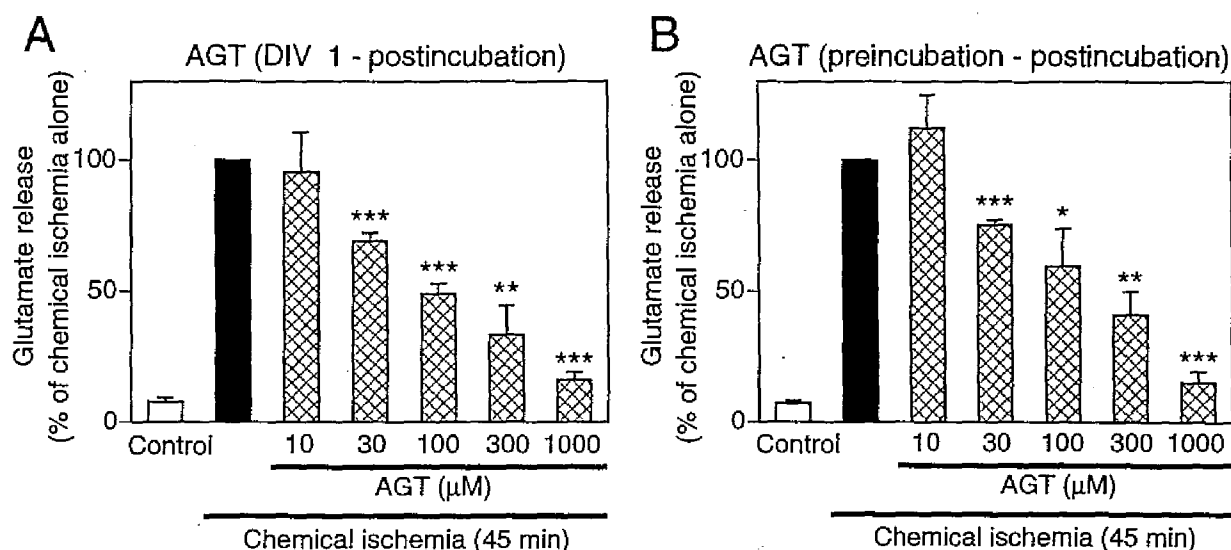


図 3-17 化学的虚血誘発グルタミン酸遊離量増大に対する AGT の濃度依存的抑制作用

AGT は培地あるいは Ringer's 緩衝液に添加して培養初日より (A)、または化学的虚血負荷 1 時間前より (B)、虚血負荷後の 24 時間の postincubation 終了時まで継続的に切片に投与した。グルタミン酸遊離量は化学的虚血負荷中の Ringer's 緩衝液を用いて定量 kit により測定した。n = 5-13. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs chemical ischemia alone.

AGT のグルタミン酸遊離抑制作用の投与期間依存性

最後に、AGT のグルタミン酸遊離抑制作用における投与期間依存性について検討を行った。その結果、虚血負荷 1 時間前より負荷 24 時間後の postincubation 終了時まで AGT の投与を行った切片においては、慢性的な（培養初日からまたは培養 6 日目から）AGT 投与の有無にかかわらず顕著なグルタミン酸遊離抑制作用が認められた（図 3-18）。培養初日から 5 日間 AGT を投与した後に 5 日間投与を中止した切片においては、有意ではあるものの部分的なグルタミン酸遊離抑制作用しか観察されなかった。以上の結果より、化学的虚血誘発グルタミン酸遊離に対する AGT の抑制作用は、培養切片への急性的な作用に基づいて発現することが示唆された。

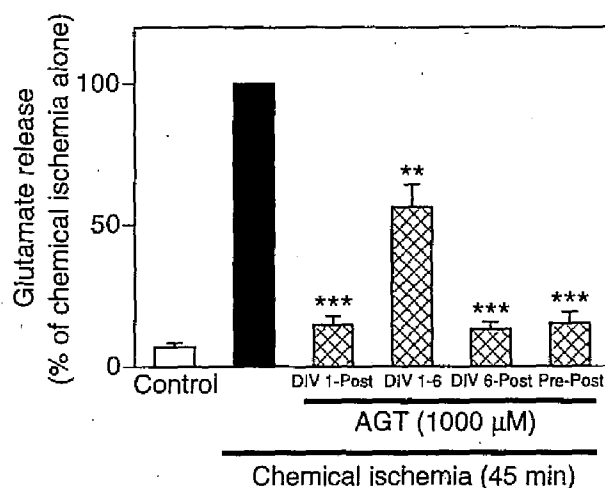


図 3-18 AGT によるグルタミン酸遊離抑制作用の投与期間依存性

AGT は培地または Ringer's 緩衝液に添加して、指示された期間に投与した。DIV 1-Post; 培養初日より化学的虚血負荷後の 24 時間の postincubation 終了時まで、DIV 1-6; 培養初日より培養 6 日目まで、DIV 6-Post; 培養 6 日目より postincubation 終了時まで、Pre-Post; 化学的虚血負荷 1 時間前より postincubation 終了時まで。グルタミン酸遊離量は化学的虚血負荷中の Ringer's 緩衝液を用いて定量 kit により測定した。n = 7. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs chemical ischemia alone.

考 察

本研究により、AGTの慢性投与が脳皮質神経細胞の興奮毒性に対する感受性を顕著に減弱させる一方で、AGTが急性的にも作用してグルタミン酸の過剰遊離を阻害し、虚血傷害を顕著に抑制すること、およびこれらの作用はステロイドホルモンの生合成抑制作用には依存しないことが明らかとなった。AGTを前処置することにより興奮毒性に対して保護作用が観察される現象は、網膜において報告されている[21]。しかしながら、網膜におけるAGTの保護作用に関しては、P450 sccの阻害によるPREGSの新規合成の抑制に基づくことが示されている。AGTがステロイドホルモン合成阻害作用には依存しない機序によって、興奮毒性または虚血傷害に対して著明な保護作用を発揮するという本研究の報告は、AGTの保護作用に関して新規作用機序を提唱するものである。

AGTは当初、鎮静作用を有する glutethimide 誘導体として開発され、1958年米国にて抗けいれん薬として臨床使用の認可を受けた。しかしながら、重篤な副作用として副腎不全が多数報告され、1966年販売中止に至るという経緯を有する[16]。その後の研究によりAGTはcholesterolをpregnenoloneに変換する酵素であるP450 sccおよびestrogenの産生を担うaromataseに対して強い阻害活性を有することが明らかとなり[16,69]、そのaromatase阻害活性が認められ1982年tamoxifen抵抗性乳癌の治療薬として臨床使用が再開された。AGTは全てのステロイドホルモンに対してその生合成を抑制するため、投与時にはcortisolの補充が必要であるが、現在においても米国では前立腺癌や乳癌などのホルモン依存性悪性腫瘍の二次的治療薬として広く用いられている[51,55]。これらの臨床実績より、AGTの薬効を他の疾患に適用拡大することは決して不可能な試みではないと推測される。

興奮毒性に対するAGTの保護作用は慢性投与を行うことで、より顕著に観察された。さらに培養脳皮質切片を用いた検討においてはNMDAとの同時処置または24時間の前処置およびNMDAとの同時処置によっては有意な作用は観察されなかったが、AGTを5日間以上投与することにより顕著な保護作用が誘導された。これらの結果はAGTの保護作用がNMDA受容体に対する急性的な遮断作用を介しているわけではないことを示している。

グルタミン酸受容体アゴニストであるNMDA、カイニン酸およびAMPAなどの神経毒により惹起される傷害においては、AGTは顕著かつ濃度依存的な保護作用を発揮したのに比べて、非特異的な細胞毒であるionomycinまたはstaurosporineにより惹起される細胞死に対しては有意な作用は及ばなかった。さらに、AGTの保護作用はNMDA処置の5日前からAGTを投与した切片では顕著に観察されたのに対して、培養初日から5日間AGTを投与した後に5日間の回復期間をおいた切片においては観察されなかった。これらの結果は、神経細胞死の発現過程において特異的に活性化される何らかの経路をAGTが可逆的に調節している可能性を示唆している。

AGTの作用点としては、全てのステロイドホルモンの前駆体であるpregnenoloneを生成する酵素であるP450 sccに対する阻害、およびエストロゲンの生合成において最終段階の反応を担う酵素であるaromataseに対する阻害が主に知られている。そこでP450 sccを阻害するAGT以外の薬物として抗真菌薬であるketoconazoleを用い、その慢性投与の興奮毒性に対する影響を検討したが有意な影響は与えなかった。しかし本研究ではAGTを慢性的に投与した際の保護作用は100 μ M以上より観察されているのに対して、50 μ M以上の濃度のketoconazoleは顕著な単独毒性を示すため、30 μ Mまでの濃度のketoconazoleしか投与することができなかった。一方、ketoconazoleのP450 sccに対する阻害は比較的弱くAGTよりも高濃度を必要とすることが示されていることから[5]、ketoconazoleによるP450 sccの活性に対する阻害は不完全であっ

た可能性が高い。このことから AGT の保護作用が P450 scc に対する阻害作用を介している可能性は排除できないと推察される。

エストロゲン産生を抑制する aromatase 選択的阻害薬は乳癌の治療薬として用いられることから、P450 scc とは異なり選択的な阻害薬が数多く開発されている。そこでステロイド型非可逆的 aromatase 阻害薬として近年臨床使用が開始された exemestane を培養大脳皮質切片に慢性的に投与することにより aromatase を選択的に阻害した際の興奮毒性に対する感受性について検討したところ、有意な影響は観察されなかった。このことから、AGT の興奮毒性に対する保護作用が aromatase 阻害を介して発揮されている可能性は排除できることが明らかとなった。

AGT は全てのステロイドホルモンの生合成を抑制することから、AGT の保護作用が大脳皮質で生合成されるいずれかのステロイドホルモン量の減少、言い換えるとそのステロイドホルモンが及ぼす何らかの生理的作用の減弱に起因することは当然想定される。そこで AGT 以外のステロイドホルモン合成酵素阻害薬として sulfotransferase の阻害薬である DCNP、 3β -HSD の阻害薬である trilostane および aromatase の選択的阻害薬である exemestane を慢性投与した際の興奮毒性に対する脆弱性の変化について検討したが、有意な作用は観察されなかった。また AGT が阻害活性を示す酵素である aromatase および P450 scc の代謝産物である estrone、estradiol、estriol および pregnenolone を無血清培地条件下において慢性的に添加した際の AGT の保護作用について検討したが有意な変化は観察されなかった。これらの結果は、AGT による興奮毒性減弱作用がステロイドホルモン涸渇作用とは異なる作用を介していることを示唆している。しかしながら、神経細胞が変性・脱落に至る過程のうち、より下流において AGT の保護作用が発揮されていると仮定すると、ステロイドホルモン涸渇作用が興奮毒性に対して与える影響が AGT の顕著な保護作用によりマスクされていたという推測は否定できない。言い換えれば、AGT の慢性投与により切片内のステロイドホルモン含有量が減少した結果、興奮毒性が増悪または減弱といった何らかの調節を受けていたとしても、AGT が新規の経路を介して興奮毒性の発現を強く減弱していた場合、ステロイドホルモン減少に起因する何らかの作用が観察されなくなっていたという可能性を完全に排除することはできない。そのため興奮毒性に対する内在性のステロイドホルモンの役割を追求するには AGT の慢性投与以外の手法の導入が必要であると考えられる。

培養大脳皮質切片における化学的虚血誘発神経細胞死に対して AGT を投与することにより顕著な減弱作用が観察され、その作用は NMDA 誘発神経細胞死に対する作用とは異なり、虚血負荷の 1 時間前からの短時間投与によっても顕著であった。さらに虚血負荷中の Ringer's 緩衝液に漏出するグルタミン酸遊離量を測定したところ、AGT の短時間投与によっても顕著な遊離量抑制作用が観察された。このように AGT が急性的な作用を示すことは、AGT による虚血傷害減弱作用においてステロイドホルモン涸渇作用がほとんど関与しないことを示すものであり、さらに AGT が阻害作用を示す P450 scc または aromatase がステロイドホルモン産生以外の未知の酵素活性を発揮することにより興奮毒性および虚血傷害を増悪しているとは考えにくいこと、AGT が阻害する新規の標的酵素として報告された PKA の慢性阻害を行っても興奮毒性は何ら調節を受けないこと、および虚血傷害を惹起するグルタミン酸の過剰遊離に対して AGT が急性的に抑制作用を示すという結果を重ね合わせると、AGT には新規の標的分子または標的酵素が存在し、AGT により誘導される保護作用はそのような経路を介して発揮されていると考えるのが妥当である。

グルタミン酸は病態時に過剰遊離されることにより神経毒性を惹起するが、生理的条件下ではむしろ興奮性神経伝達を担う重要なアミノ酸として働くことが広く認められている。また NMDA 受容体遮断薬は *in vivo* ラットモデルにおける虚血傷害を顕著に減弱する一方で、慢性投与されることにより精神異常や記憶・学習障害を誘発することが報告されている [36,52]。

本研究において培養大脳皮質神経細胞に慢性的に10-1000 μM のAGTを添加した際のグルタミン酸応答について細胞内 Ca^{2+} イメージング法を用いて検討したが、グルタミン酸単独投与群に比べて若干の抑制傾向は観察されるものの有意な変化は認められず、MK-801投与時に観察されるような顕著な抑制作用は認められなかった。これらの結果は大脳皮質神経細胞におけるグルタミン酸受容体を介した生物学的反応はAGTの慢性投与によってもほぼ保持されていることを示唆するものであり、NMDA受容体遮断薬の慢性投与時に報告されているような副作用が誘発される可能性は小さいということが示唆される。このことは、臨床においてAGTの継続投与を受けている患者において鎮静作用は高頻度に認められるものの、精神異常や記憶・学習障害などの副作用はほとんど観察されていないという所見からも立証される[55]。さらに慢性的に10-1000 μM のAGTを負荷した神経細胞においてもグルタミン酸誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は顕著に観察されたことから、グルタミン酸受容体の過剰刺激から神経細胞死へと至る経路のうち、AGTは細胞内への過剰量の Ca^{2+} 流入過程以降のいずれかの経路を抑制することにより保護作用を発現するということが明らかとなった。

臨床実績のある薬物の *in vitro* モデルにおける作用を検討した研究においては、しばしばその有効濃度域が問題になることがある。AGTの1日の通常服用量は250-1000 mgと規定されており、1日500 mgの服用を行った男性健常人の血中濃度は5.9 $\mu\text{g/ml}$ (= 25.4 μM) [55]、さらにホルモン依存性悪性腫瘍の患者に対して1日1000 mgの服用を行った際の血中濃度は9.0 $\mu\text{g/ml}$ (= 38.7 μM) と報告されている[51]。AGTの脳移行性については未解明な点が多いが、Ungerらはラットにおいて ^{14}C 標識AGTを末梢から投与すると容易に脳内へ取り込まれることを報告している[79]。さらにAGTが開発当初は抗けいれん薬として使用されていた経緯も踏まえると、AGTはヒト体内においても脳移行性が高い薬物であると推定され、本研究において興奮毒性および虚血傷害に有意な保護作用を発揮したAGTの濃度である10-30 μM に達する可能性は十分に考えられる。

結論として、AGTは慢性投与することによりステロイドホルモン潤滑作用とは異なる作用を介して濃度依存的な興奮毒性減弱作用を示し、さらに急性的な作用により化学的虚血負荷により誘発される過剰なグルタミン酸遊離を抑制して虚血傷害を濃度依存的に減弱することが明らかになり、AGTが興奮毒性および虚血傷害に対する有力な神経保護物質として働くことが示された。

総括および結論

本研究において著者は、その脳内における生合成が近年証明されつつあるニューロアクティブステロイドの興奮毒性に対する役割を解明することは中枢神経変性疾患の予防・治療薬と成り得るリード化合物の創製に重要な役割を果たすと考え、培養大脳皮質神経細胞を用いて興奮毒性に対するニューロアクティブステロイドの制御作用について解析した結果、以下の新知見を得た。

1. NMDA 受容体の過剰刺激により惹起される神経細胞死に対して、代表的なニューロアクティブステロイドの中で $3\alpha,5\beta$ S が抑制作用を示す一方で、PREGS およびその合成類似体の PHS は増悪することを見出した。さらにこれらニューロアクティブステロイドの作用はタンパク合成阻害薬である cycloheximide や GABA_A 受容体遮断薬である picrotoxin の投与によっても影響を受けなかった。ホールセルパッチクランプ法により検討したところ、 $3\alpha,5\beta$ S は NMDA 誘発電流応答を顕著に抑制し、逆に PHS は増強したが、PREGS は有意な作用を示さなかった。細胞内 Ca^{2+} 濃度測定法を用いて検討を行うと、 $3\alpha,5\beta$ S はグルタミン酸により誘発される細胞内 Ca^{2+} 濃度増大応答を顕著に抑制し、逆に PHS は増強した。PREGS は細胞内 Ca^{2+} 濃度増大応答のピーク値に対しては影響を及ぼさなかったが、ピーク後の減衰を顕著に遅延した。以上の結果より、ニューロアクティブステロイドが急性的に NMDA 受容体機能を調節することにより NMDA 誘発神経細胞死に影響を及ぼすことが明らかとなった。

2. カイニン酸誘発神経細胞死に対して、代表的なニューロアクティブステロイドのうちで PREGS が顕著な保護作用を示すことを見出した。PREGS の神経保護作用は cycloheximide やグルココルチコイド受容体遮断薬である RU-486、および picrotoxin の投与によっても影響を受けなかった。ホールセルパッチクランプ法および細胞内 Ca^{2+} 濃度測定法を用いて検討したところ、PREGS はカイニン酸により誘発される電流および細胞内 Ca^{2+} 濃度の増大を抑制した。AMPA の投与により惹起される神経細胞死においても同様に、PREGS は AMPA 受容体応答を減弱することにより神経細胞に対する保護作用を示した。以上の結果から、PREGS は急性的に non-NMDA 受容体機能を抑制してカチオン流入量を減少させることにより、カイニン酸および AMPA 誘発神経細胞死を減弱することが明らかとなった。

3. ステロイドホルモン合成阻害作用を有する AGT の慢性投与により、初代培養大脳皮質細胞におけるグルタミン酸神経毒性は減弱され、その保護作用は AGT を培養翌日より慢性投与した際に特に顕著に観察された。培養大脳皮質切片を用いた検討においても AGT の細胞死保護作用が観察されたが、各種ステロイドホルモンの添加はその保護作用に影響を与えなかった。一方、培養大脳皮質切片に化学的虚血を負荷した際に誘導されるグルタミン酸遊離量の増大および細胞障害は AGT により減弱した。これらの結果から、AGT の長期間投与によりニューロアクティブステロイド潤滑作用とは異なる作用を介して、大脳皮質神経細胞の興奮毒性に対する感受性が減弱され、虚血傷害に対する抵抗性が獲得されることが明らかとなった。

本研究の成果は、ニューロアクティブステロイドが大脳皮質における興奮性神経毒性の制御系として働くこと、およびホルモン依存性悪性腫瘍治療薬である AGT が興奮毒性および虚血傷害に対して神経保護活性を有することを明らかにしたものであり、脳虚血および種々の難治性中枢神経変性疾患の予防・治療薬の開発において有用な基礎的資料を提供するものである。

謝 辞

本研究に際しまして、終始懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 赤池 昭紀 教授に謹んで感謝の意を表します。また直接ご指導を賜り、多くの有益なご助言を頂きました京都大学大学院薬学研究科 香月 博志 助教授に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益なご助言を頂きました奈良先端科学技術大学院大学 佐藤 公道 先生、京都大学大学院薬学研究科 金子 周司 教授、杉本 八郎 教授、南 雅文 助教授、新留 徹広 助教授、久米 利明 助手、中川 貴之 助手、並びに木原 武士 助手に深く感謝いたします。

さらに、本研究の実験技術に際しまして有益なご助言を頂きました京都大学大学院医学研究科 伊藤 壽一 教授に心から感謝いたします。

また日々の研究生活に専念するにあたり同級生として互いに励まし合い、高め合うことのできた 篠原 温美 さん、高鳥（高田） 悠記 さん、田口 良太 君に心からお礼を述べたいと思います。さらに、同じ研究グループとして互いに切磋琢磨し合えた 柴田 治樹 君、中田 大介 君、藤本 真二 君、西脇 真由美 さん、野中 美妃 さん、大川原 賦 君、浜 康博 君、渡邊 佳典 君をはじめ薬品作用解析学分野、生体機能解析学分野、医療薬理学分野並びに創薬神経科学分野の皆さんに深く感謝いたします。

最後に、著者の良き理解者であり、研究に専心できる自由を与えてくださった父 裕久、母 順子に心から感謝いたします。

発表論文目録

本研究内容の一部は以下の論文に公表した。

- 1) Shirakawa H, Katsuki H, Kume T, Kaneko S, Ito J, Akaike A. (2002)
Regulation of *N*-methyl-D-aspartate cytotoxicity by neuroactive steroids in rat cortical neurons.
European Journal of Pharmacology **454**, 165-175.
- 2) Shirakawa H, Katsuki H, Kume T, Kaneko S, Akaike A. (2005)
Pregnenolone sulfate attenuates AMPA cytotoxicity on rat cortical neurons.
European Journal of Neuroscience 印刷中

引用文献

1. 赤池昭紀 (1994) グルタミン酸神経毒性と神経保護因子
日本薬理学雑誌, 103, 193-201
2. Akaike A, Tamura Y, Terada K, Nakata N. (2004) Regulation by neuroprotective factors of NMDA receptor mediated nitric oxide synthesis in the brain and retina. *Prog. Brain Res.* **103**, 391-403.
3. Alshowaier IA, el-Yazigi A, Ezzat A, Abd el-Warith A, Nicholls PJ. (1999) Pharmacokinetics of *S*- and *R*-enantiomers of aminoglutethimide following oral administration of racemic drug in breast cancer patients. *J. Clin. Pharmacol.* **39**, 1136-1142.
4. Azcoitia I, Sierra A, Garcia-Segura LM. (1998) Estradiol prevents kainic acid-induced neuronal loss in the rat dentate gyrus. *Neuroreport* **9**, 3075-3079.
5. Bastida CM, Tejada F, Cremades A, Penafiel R. (2001) Aminoglutethimide, a steroidogenesis inhibitor, abolishes hormonal induction of ornithine decarboxylase in steroidogenic tissues: evidence for its role as cAMP-dependent protein kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 244-248.
6. Baulieu EE. (1997) Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog. Horm. Res.* **52**, 1-32.
7. Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F. (1997) Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol. Pharmacol.* **51**, 535-541.
8. Bergeron R, de Montigny C, Debonnel G. (1996) Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: effects mediated via sigma receptors. *J. Neurosci.* **16**, 1193-1202.
9. Ceccon M, Rumbaugh G, Vicini S. (2001) Distinct effect of pregnenolone sulfate on NMDA receptor subtypes. *Neuropharmacology* **40**, 491-500.
10. Choi DW. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**, 623-634.
11. Corpechot C, Synguelakis M, Talha S, Axelson M, Sjovall J, Vihko R, Baulieu EE, Robel P. (1983) Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Res.* **270**, 119-125.
12. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH. (1991) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6368-6371.
13. Dildy-Mayfield JE, Harris RA. (1994) Activation of protein kinase C inhibits kainate-induced currents in oocytes expressing glutamate receptor subunits. *J. Neurochem.* **62**, 1639-1642.
14. Fancsik A, Linn DM, Tasker JG. (2000) Neurosteroid modulation of GABA IPSCs is phosphorylation dependent. *J. Neurosci.* **20**, 3067-3075.
15. Flood JF, Morley JE, Roberts E. (1995) Pregnenolone sulfate enhances post-training memory processes when injected in very low doses into limbic system structures: the amygdala is by far the most sensitive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10806-10810.
16. Foster AB, Jarman M, Leung CS, Rowlands MG, Taylor GN. (1983) Analogues of aminoglutethimide: selective inhibition of cholesterol side-chain cleavage. *J. Med. Chem.* **26**, 50-54.
17. Fujimoto S, Katsuki H, Kume T, Kaneko S, Akaike A. (2004) Mechanisms of oxygen glucose deprivation-induced glutamate release from cerebrocortical slice cultures. *Neurosci. Res.* **50**, 179-187.
18. Gasior M, Carter RB, Witkin JM. (1999) Neuroactive steroids: potential therapeutic use in neurological and psychiatric disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 107-112.
19. Greengard P, Jen J, Nairn AC, Stevens CF. (1999) Enhancement of the glutamate response by cAMP-dependent protein kinase in hippocampal neurons. *Science* **253**, 1135-1138.
20. Gu Q, Moss RL. (1996) 17β -Estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of the cAMP cascade. *J. Neurosci.* **16**, 3620-3629.
21. Guarneri P, Russo D, Cascio C, De Leo G, Piccoli F, Guarneri R. (1998) Induction of neurosteroid synthesis by NMDA receptors in isolated rat retina: a potential early event in excitotoxicity. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 1752-1763.

22. Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WG, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S. (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P450 17 α and P450 aromatase localized in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 865-70.
23. Honda K, Shimohama S, Sawada H, Kihara T, Nakamizo T, Shibasaki H, Akaike A. (2001) Nongenomic antiapoptotic signal transduction by estrogen in cultured cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* **64**, 466-475.
24. Horak M, Vlcek K, Petrovic M, Choudounska H, Vyklicky L Jr. (2004) Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. *J. Neurosci.* **24**, 10318-10325.
25. Irwin RP, Lin SZ, Rogawski MA, Purdy RH, Paul SM. (1994) Steroid potentiation and inhibition of *N*-methyl-D-aspartate receptor-mediated intracellular Ca⁺⁺ responses: Structure-activity studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**, 677-682.
26. Iwamori M, Moser HW, Kishimoto Y. (1976) Steroid sulfatase in brain: comparison of sulfohydrolase activities for various steroid sulfates in normal and pathological brains, including the various forms of metachromatic leukodystrophy. *J. Neurochem.* **27**, 1389-1395.
27. Iwasaki K, Chung EH, Egashira N, Hatip-Al-Khatib I, Mishima K, Egawa T, Irie K, Fujiwara M. (2004) Non-NMDA mechanism in the inhibition of cellular apoptosis and memory impairment induced by repeated ischemia in rats. *Brain Res.* **995**, 131-139.
28. Jang MK, Mierke DF, Russek SJ, Farb DH. (2004) A steroid modulatory domain on NR2B controls *N*-methyl-D-aspartate receptor proton sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 8198-8203.
29. Kaasik A, Safiulina D, Kalda A, Zharkovsky A. (2003) Dehydroepiandrosterone with other neurosteroids preserve neuronal mitochondria from calcium overload. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **87**, 97-103.
30. Kan PB, Hirst MA, Feldman D. (1985) Inhibition of steroidogenic cytochrome P-450 enzymes in rat testis by ketoconazole and related imidazole anti-fungal drugs. *J. Steroid Biochem.* **23**, 1023-1029.
31. Katsuki H, Shinohara A, Fujimoto S, Kume T, Akaike A. (2005) Tetraethylammonium exacerbates ischemic neuronal injury in rat cerebrocortical slice cultures. *Eur. J. Pharmacol.* **508**, 85-91.
32. Kawasaki-Yatsugi S, Ichiki C, Yatsugi S, Takahashi M, Shimizu-Sasamata M, Yamaguchi T and Minematsu K. (2000) Neuroprotective effects of an AMPA receptor antagonist YM872 in a rat transient middle cerebral artery occlusion model. *Neuropharmacology* **39**, 211-217.
33. Kimonides VG, Khatibi NH, Svendsen CN, Sofroniew MV, Herbert J. (1998) Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1852-1857.
34. Kimonides VG, Spillantini MG, Sofroniew MV, Fawcett JW, Herbert J. (1999) Dehydroepiandrosterone antagonizes the neurotoxic effects of corticosterone and translocation of stress-activated protein kinase 3 in hippocampal primary cultures. *Neuroscience* **89**, 429-436.
35. Kimoto T, Tsurugizawa T, Ohta Y, Makino J, Tamura Ho, Hojo Y, Takata N, Kawato S. (2001) Neurosteroids synthesis by cytochrome P450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: *N*-methyl-D-aspartate and calcium-dependent synthesis. *Endocrinology* **142**, 3578-3589.
36. Koek W, Woods JH, Winger GD. (1988) MK-801, a proposed noncompetitive antagonist of excitatory amino acid neurotransmission produces phencyclidine-like behavioral effects in pigeons, rats and rhesus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **245**, 969-974.
37. Koh JY, Gorldberg MP, Hartley DM, Choi DW. (1990) Non-NMDA receptor-mediated neurotoxicity in cortical culture. *J. Neurosci.* **10**, 693-705.
38. Koike M, Iino M, Ozawa S. (1997) Blocking effect of 1-naphthyl acetyl spermine on Ca²⁺-permeable AMPA receptors in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* **29**, 27-36.
39. Kume T, Nishikawa H, Taguchi R, Hashino A, Katsuki H, Kaneko S, Minami M, Satoh M, Akaike A. (2002) Antagonism of NMDA receptors by sigma receptor ligands attenuates chemical ischemia-induced neuronal death in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **455**, 91-100.

40. Kurata K, Takebayashi M, Morinobu S, Yamawaki S. (2004) β -Estradiol, dehydroepiandrosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate protect against *N*-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by different mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311**, 237-245.
41. Lambert JJ, Belelli D, Peden DR, Vardy AW, Peters JA. (2003) Neurosteroid modulation of GABA_A receptors. *Prog. Neurobiol.* **71**, 67-80.
42. Lan JY, Skeberdis VA, Jover T, Grooms SY, Lin Y, Araneda RC, Zheng X, Bennett MV, Zukin RS. (2001) Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nature Neurosci.* **4**, 382-390.
43. Lapchak PA, Araujo DM. (2001) Preclinical development of neurosteroids as neuroprotective agents for the treatment of neurodegenerative diseases. *Int. Rev. Neurobiol.* **46**, 379-397.
44. Malayev A, Gibbs TT, Farb DH. (2002) Inhibition of the NMDA response by pregnenolone sulphate reveals subtype selective modulation of NMDA receptors by sulphated steroids. *Br. J. Pharmacol.* **135**, 901-909.
45. Malenka RC, Nicoll RA. (1999) Long-term potentiation - a decade of progress? *Science* **285**, 1870-1874.
46. Maurice T, Urani A, Phan VL, Romieu P. (2001) The interaction between neuroactive steroids and the σ_1 receptor function: behavioral consequences and therapeutic opportunities. *Brain Res. Rev.* **37**, 116-132.
47. McEwen BS. (1991) Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**, 141-147.
48. Meldrum B, Garthwaite J. (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 379-387.
49. Mellon SH and Griffin LD. (2002) Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol. Metab.* **13**, 35-43.
50. di Michele F, Lekieffre D, Pasini A, Bernardi G, Benavides J, Romeo E. (2000) Increased neurosteroids synthesis after brain and spinal cord injury in rats. *Neurosci. Lett.* **284**, 65-68.
51. Miller AA, Miller BE, Hoffken K, Schmidt CG. (1987) Clinical pharmacology of aminoglutethimide in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **20**, 337-341.
52. Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* **319**, 774-776.
53. Muir JK, Lobner D, Monyer H, Choi DW. (1996) GABA_A receptor activation attenuates excitotoxicity but exacerbates oxygen-glucose deprivation-induced neuronal injury in vitro. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **16**, 1211-1218.
54. Monnet FP, Mahe V, Robel P, Baulieu EE. (1995) Neurosteroids, via sigma receptors, modulate the [³H] norepinephrine release evoked by *N*-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3774-3778.
55. NOVARTIS Cytadren Tablets (aminoglutethimide tablets USP), Prescribing Information (2002)
56. Ohkuma S, Chen SH, Katsura M, Chen DZ, Kuriyama K. (1994) Muscimol prevents neuronal injury by NMDA. *Jpn. J. Pharmacol.* **64**, 125-128.
57. O'Neill MJ, Bogaert L, Hicks CA, Bond A, Ward MA, Ebinger G, Ornstein PL, Michotte Y, Lodge D. (2000) LY377770, a novel iGlu5 kainate receptor antagonist with neuroprotective effects in global and focal cerebral ischaemia. *Neuropharmacology* **39**, 1575-1588.
58. Paternain AV, Morales M, Lerma J. (1995) Selective antagonism of AMPA receptors unmasks kainate receptor-mediated responses in hippocampal neurons. *Neuron* **14**, 185-189.
59. Park-Chung M, Malayev A, Purdy RH, Gibbs TT, Farb DH. (1999) Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acid_A receptor function through distinct sites. *Brain Res.* **830**, 72-87.
60. Park-Chung M, Wu FS, Purdy RH, Malayev AA, Gibbs TT, Farb DH. (1997) Distinct sites for inverse modulation of *N*-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Mol. Pharmacol.* **52**, 1113-1123.
61. Pearson-Murphy BE, Steinberg SI, Hu FY, Allison CM. (2001) Neuroactive ring A-reduced metabolites of progesterone in human plasma during pregnancy: elevated levels of 5 alpha-dehydropregesterone in depressed patients during the latter half of pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 5981-5987.
62. Rajkowski KM, Robel P, Baulieu EE. (1997) Hydroxysteroid sulfotransferase activity in the rat brain and liver as a function of age and sex. *Steroids* **62**, 427-436.

63. Raymond LA, Blackstone CD, Haganir RL. (1993) Phosphorylation and modulation of recombinant GluR6 glutamate receptors by cAMP-dependent protein kinase. *Nature* **361**, 637-641.
64. Reddy DS. (2003) Pharmacology of endogenous neuroactive steroids. *Crit. Rev. Neurobiol.* **15**, 197-234.
65. Roy J, Minotti S, Dong L, Figlewicz DA, Durham HD. (1998) Glutamate potentiates the toxicity of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase in motor neurons by postsynaptic calcium-dependent mechanisms. *J. Neurosci.* **18**, 9673-9684.
66. Rupprecht R, Holsboer F. (1999) Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci.* **9**, 410-416.
67. Rupprecht R, Berning B, Hauser CA, Holsboer F, Reul JM. (1996) Steroid receptor-mediated effects of neuroactive steroids: characterization of structure-activity relationship. *Eur. J. Pharmacol.* **303**, 227-234.
68. Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K. (2001) Effects of progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell on its dendritic growth and synaptogenesis. *J. Neurosci.* **21**, 6221-6232.
69. Salhanick HA. (1982) Basic studies on aminoglutethimide. *Cancer Res.* **42**(8 Suppl), 3315s-3321s.
70. Sanne JL and Krueger KE. (1995) Expression of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat central nervous system: a study by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *J. Neurochem.* **65**, 528-536.
71. Sheardown MJ, Nielsen EO, Hansen AJ, Jacobsen P, Honore T. (1990) 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(F)quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. *Science* **247**, 571-574.
72. Sheardown MJ, Suzdak PD, Nordholm L. (1993) AMPA, but not NMDA, receptor antagonism is neuroprotective in gerbil global ischaemia, even when delayed 24 h. *Eur. J. Pharmacol.* **236**, 347-353.
73. Shirakawa H, Katsuki H, Kume T, Kaneko S, Ito J, Akaike A. (2002) Regulation of *N*-methyl-D-aspartate cytotoxicity by neuroactive steroids in rat cortical neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **454**, 165-75.
74. Simon RP, Swan JH, Griffiths T, Meldrum BS. (1994) Blockade of *N*-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* **226**, 850-852.
75. Singer CA, Rogers KL, Strickland TM, Dorsa DM. (1996) Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neurosci. Lett.* **212**, 13-16.
76. Spivak V, Lin A, Beebe P, Stoll L, Gentile L. (2004) Identification of a neurosteroid binding site contained within the GluR2-S1S2 domain. *Lipids* **39**, 811-819.
77. Steckelbroeck S, Nassen A, Ugele B, Ludwig M, Watzka M, Reissinger A, Clusmann H, Lutjohann D, Siekmann L, Klingmuller D, Hans VH. (2004) Steroid sulfatase (STS) expression in the human temporal lobe: enzyme activity, mRNA expression and immunohistochemistry study. *J. Neurochem.* **89**, 403-417.
78. Stoffel-Wagner B. (2001) Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur. J. Endocrinol.* **145**, 669-679.
79. Unger C, Eibl H, von Heyden HW, Kim DJ, Nagel GA. (1986) Aminoglutethimide. Penetration of the blood brain barrier. *Invest. New Drugs* **4**, 237-240.
80. Van Damme P, Leyssen M, Callewaert G, Robberecht W, Van Den Bosch L. (2003) The AMPA receptor antagonist NBQX prolongs survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* **343**, 81-84.
81. Veiga S, Garcia-Segura LM, Azcoitia I. (2003) Neuroprotection by the steroids pregnenolone and dehydroepiandrosterone is mediated by the enzyme aromatase. *J. Neurobiol.* **56**, 398-406.
82. Waters SL, Miller GW, Aleo MD, Schnellmann RG. (1997) Neurosteroid inhibition of cell death. *Am. J. Physiol.* **273**, F869-876.
83. Weaver CE, Land MB, Purdy RH, Richards KG, Gibbs TT, Farb DH. (2000) Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on *N*-methyl-D-aspartate receptor-induced Ca²⁺ accumulation and cell death. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293**, 747-754.
84. Weaver CE Jr, Marek P, Park-Chung M, Tam SW, Farb DH. (1997) Neuroprotective activity of a new class of steroidal inhibitors of the *N*-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10450-10454.
85. Weaver CE Jr, Park-Chung M, Gibbs TT, Farb DH. (1997) 17 β -Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res.* **761**, 338-41.

86. Weaver CE Jr, Wu FS, Gibbs TT, Farb DH. (1998) Pregnenolone sulfate exacerbates NMDA-induced death of hippocampal neurons. *Brain Res.* **803**, 129-136.
87. Weill-Engerer S, David JP, Sazdovitch V, Liere P, Eychenne B, Pianos A, Schumacher M, Delacourte A, Baulieu EE, Akwa Y. (2002) Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 5138-5143.
88. Weiss JH, Sensi SL. (2000) Ca^{2+} - Zn^{2+} permeable AMPA or kainate receptors: possible key factors in selective neurodegeneration. *Trends Neurosci.* **23**, 365-371.
89. Williamson J, Mtchedlishvili Z, Kapur J. (2004) Characterization of the convulsant action of pregnenolone sulfate. *Neuropharmacology* **46**, 856-864.
90. Wu FS, Chen SC. (1997) Mechanism underlying the effect of pregnenolone sulfate on the kainate-induced current in cultured chick spinal cord neurons. *Neurosci. Lett.* **222**, 79-82.
91. Wu FS, Gibbs TT, Farb DH. (1991) Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the *N*-methyl-D-aspartate receptor. *Mol. Pharmacol.* **40**, 333-336.
92. Woo LW, Purohit A, Reed MJ, Potter BV. (1996) Active site directed inhibition of estrone sulfatase by nonsteroidal coumarin sulfamates. *J. Med. Chem.* **39**, 1349-1351
93. Yaghoubi N, Malayev A, Russek SJ, Gibbs TT, Farb DH. (1998) Neurosteroid modulation of recombinant ionotropic glutamate receptors. *Brain Res.* **803**, 153-160.
94. Yu XM, Askalan R, Keil GJ 2nd, Salter MW. (1997) NMDA channel regulation by channel-associated protein tyrosine kinase Src. *Science* **275**, 674-678.
95. Zhou N, Hammerland LG, Parks TN. (1993) γ -D-Glutamylaminomethyl sulfonic acid (GAMS) distinguishes kainic acid- from AMPA-induced responses in *Xenopus* oocytes expressing chick brain glutamate receptors. *Neuropharmacology* **32**, 767-775.
96. Zwain IH, Yen SS. (1999) Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* **140**, 3843-3852.